

Hemmstoffe des Elektronentransports in
Rhodobacter sphaeroides

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Silvana Preuße
Wolfenbüttel

Bochum 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543113_0054

Hemmstoffe des Elektronentransports in

Rhodobacter sphaeroides

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Silvana Preuße

Wolfenbüttel

Bochum 1988

Referent: Prof. Dr. W. Oettmeier

Korreferent: Prof. Dr. E. Weiler

Tag der mündlichen Prüfung:

15.12.1988

Axel, meinen Eltern

Herrn Prof. Dr. Trebst danke ich für die
Arbeitsmöglichkeit an seinem Lehrstuhl.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn
Prof. Dr. Oettmeier bedanken, der mir als
Lebensmittelchemikerin sehr viel Verständnis
entgegenbrachte und mir für die Zeit meiner
Tätigkeit in seiner Arbeitsgruppe stets mit
großer Geduld und ständiger Hilfsbereitschaft
zur Seite stand.

Mein Dank gilt auch Herrn Klaus Masson, sowie
anderen Mitgliedern des Lehrstuhls für ihre
freundliche technische Unterstützung.

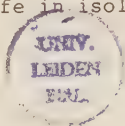
Verzeichnis der Abkürzungen und Trivialnamen

ADP	:Adenosindiphosphat
APS	:Ammoniumperoxodisulfat
ATP	:Adenosintriphosphat
Azido-Atrazin	:2-Azido-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazin
Azido-Dinoseb	:4-Nitro-2-azido-6-isobutylphenol
BChl	:Bakteriochlorophyll
BPhae	:Bakteriopheophytin
Bromanil	:Tetrabrom-1,4-benzochinon
DCMU	:3 (3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff
Dinoseb	:2,4-Dinitro-6-isobutylphenol
DNSJ	:2-Jod-4-nitro-6-isobutylphenol
Ioxynil	:4-Hydroxy-3,5-dijodobenzonitril
kDa	:Kilodalton
LDAO	:Lauryl-dimethylaminoxid
PAGE	:Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese
Phenisopham	:Isopropyl-N-(3-(N-ethyl-N-phenyl-carbamoyloxy)-phenyl-carbammat
Pikrinsäure	:2,4,6-Trinitrophenol
Plastochinon-azid	:2,3-Dimethyl-5-(4'-(3-(4-azido-2-nitro-anilino)-propionoxyl)-n-butyl)-1,4-benzochinon
PQ	:Plastochinon
PS	:Photosystem
RC	:Reaktionszentrum
RSA	:Rinderserumalbumin
SDS	:Natriumdodecylsulfat
TEMED	:N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
UQ	:Ubichinon

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Ergebnisse	15
2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an <u>Rhodobacter</u> <u>sphaeroides</u>	15
2.2 Isolierung von Chromatophoren aus <u>Rhodobacter</u> <u>sphaeroides</u>	18
2.3 Messung der cyclischen Phosphorylierung in Chromato- phoren aus <u>Rhodobacter</u> <u>sphaeroides</u>	21
2.4 Bindungs- und Verdrängungsversuche mit radioaktiv mar- kierten Hemmstoffen an Chromatophoren	26
2.5 Isolierung von Reaktionszentren aus <u>Rhodobacter</u> <u>sphaeroides</u>	38
2.6 ESR-Spektroskopische Untersuchungen an isolierten Reaktionszentren	41

	Seite
2.7 Ein Testsystem für den "steady-state" Elektronentransport in Reaktionszentren	43
2.8 Entfernung von Ubichinon aus den Reaktionszentren	45
2.9 Proteolytische Spaltung der Reaktionszentren mit Trypsin und V_8 -Protease	47
2.10 Isolierung der H-Untereinheit aus Reaktionszentren von <u>Rhodobacter sphaeroides</u>	51
2.11 Messung der photosynthetischen Aktivität eines Komplexes der L- und M- Untereinheit	53
2.12 Proteolytische Spaltung der H-Untereinheit mit V_8 -Protease	55
2.13 Herstellung von Antikörpern gegen die H-Untereinheit der Reaktionszentren	57
2.14 Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch Antikörper	60
2.15 Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch verschiedene Hemmstoffe in isolierten Reaktionszentren	62



	Seite
2.16 Identifizierung von Hemmstoffbindeproteinen in Chromatophoren und Reaktionszentren	68
2.16.1 Photoaffinitätsmarkierungsexperimente	68
2.16.2 Kovalente Bindung von Hemmstoffen durch einen Additions-/Eliminierungsmechanismus	73
3. Diskussion	77
4. Zusammenfassung	92
5. Material und Methoden	94
6. Literaturverzeichnis	124

1. Einleitung

Die Fähigkeit, Licht als Energiequelle zum Wachstum zu nutzen, besitzen neben den Pflanzen und Algen auch zwei Gruppen von Bakterien. Es handelt sich dabei um photosynthetische grüne Bakterien und um Purpurbakterien, die in der Ordnung der Rhodospirillales zusammengefaßt sind, sowie um Cyanobakterien.

Gegenüber allen anderen Photosynthese-Organismen zeichnen sich die Bakterien dadurch aus, daß sie photolithotroph oder photoorganotroph leben, d.h. als Donor für die Photosynthese nicht Wasser sondern Schwefelwasserstoff oder organische Verbindungen verwenden.

Während Chloroplasten aus höheren Pflanzen und Algen sowie Cyanobakterien zwei Photosysteme haben, besitzen die photosynthetischen Bakterien nur ein Photosystem.

Innerhalb der Gruppe der Purpurbakterien unterscheidet man zwei Familien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, elementaren Schwefel als Elektronen-Donor nutzen zu können oder nicht.

Hierbei handelt es sich um die Schwefelbakterien, oder Chromatiaceae und die schwefelfreien Purpurbakterien, die Rhodospirillaceae. Zur letzteren Gruppe zählt auch das Bakterium Rhodopseudomonas sphaeroides (nach neuerer Namensgebung Rhodobacter sphaeroides). Es ist nicht in der Lage wie die grünen Pflanzen, Wasser als Elektronen-Donor oder wie die Schwefelbakterien Schwefel als Elektronenquelle zu nutzen, sondern ist auf andere organische Verbindungen angewiesen, wie z.B. Malat.

Der gesamte Photosyntheseapparat, wie Antennenproteine und das Reaktionszentrum ist bei den Purpurbakterien auf intracytoplasmatischen Membranen lokalisiert. Sie entstehen als bläschen- oder röhrenförmige Einstülpungen auf der Cytoplasmamembran in das Zellinnere und bleiben mit ihr verbunden.

Bei diesen Chromatophoren handelt es sich um Vesikel oder Tubuli in konzentrischen oder zylindrischen Lamellenpaketen, welche man nach Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation erhält. Die Chromatophoren unterscheiden sich in ihrer Morphologie, wobei man vesikuläre, tubuläre und lammellare Formen differenzieren kann.

Diese abgetrennten Membranenfragmente enthalten die photosynthetischen Pigmente und führen den lichtinduzierten Elektronentransport, die Photophosphorylierung und die Reduktion des NAD^+ über einen energieabhängigen Elektronenfluß durch. In ihnen sind das photosynthetische Reaktionszentrum mit seinen Antennenproteinen und der Cytochrom b/c_1 -Komplex lokalisiert.

Diese Membranen beherbergen neben den Enzymen des photosynthetischen auch die Enzyme des dissimilatorischen Elektronentransports. Sie haben also Funktionen, die in den eukaryontischen Zellen auf Chloroplasten und Mitochondrien verteilt sind.

Neben Bakteriochlorophyll enthalten die Chromatophoren auch die rot gefärbten Carotinoide als accessorische Pigmente. Diese absorbieren Licht im Spektralbereich von 400-500 nm. Beide übernehmen die Lichtsammlung in der photosynthetischen Membran und übertragen die Lichtenergie auf die Reaktionszentren. Diese Antennenpigmente dehnen den Bereich des absorbierten Lichtes auf Wellenlängen aus, die von den Reaktionszentren nicht absorbiert würden (Michel, 1985).

Die bakterielle Photosynthese unterscheidet sich im Prinzip grundlegend von der Photosynthese der Eukaryonten und Blaualgen: Sie läuft strikt unter anaeroben Bedingungen und ohne Sauerstoffbildung ab. Die Bakterien besitzen nur ein Photosystem, das funktionell dem Photosystem II der Eukaryonten entspricht. Es läßt sich ohne die anhaftenden Antennenproteine isolieren.

Im Photosyntheseapparat der Bakterien läuft ein cyclischer Elektronentransport ab, an dem unter anderem Ubichinon und Cytochrom c_2 beteiligt sind, wobei nach der Lichtreaktion reduziertes Ubichinon entsteht.

Das Reaktionszentrum photosynthetischer Bakterien ist ein integraler Membranenproteinkomplex, der eine Reihe von Co-Faktoren enthält, die den Elektronenfluß bei der Photosynthese gewährleisten.

Das Reaktionszentrum setzt sich wie folgt zusammen:

Tab. 1: Zusammensetzung der Reaktionszentren schwefelfreier Purpurbakterien

<u>Proteine</u>	: ein Protein 22 kDa L (Light)-Untereinheit ein Protein 24 kDa M (Medium)-Untereinheit ein Protein 28 kDa H (Heavy)-Untereinheit
<u>Pigmente</u>	: 4 Bakteriochlorophylle a * 2 Bakteriopheophytine 2 Ubichinone (bei <u>R. viridis</u> : 1 Ubichinon und 1 Menachinon, Allen et al. 1987) 1 nicht-Häm-Eisen
<u>andere</u>	: 50-100 Detergens-Moleküle
* 2 der Bakteriochlorophylle a bilden ein Dimer	

Die Reaktionszentrumsproteine machen ca. 20-30% des gesamten Proteingehaltes von Rhodobacter sphaeroides aus (Clayton 1972).

Die von den Bakteriochlorophyll- und Carotinoid-Protein-Komplexen als Antennenpigmente absorbierte Lichtenergie wird auf das Reaktionszentrumschlorophyll-Dimer übertragen.

Analog zum Photosystem II höherer Pflanzen stellen jeweils zwei der vier Bakteriochlorophylle ein "special pair" dar. Hierbei liegen zwei Ringe des Chlorophylls (in der Abb. 2 mit I bezeichnete Ringe) übereinander, wobei die π -Elektronen zu einer Elektronenwolke verschmelzen.

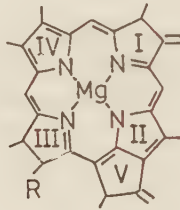


Abb. 1: Ringsystem des Bakteriochlorophylls

Ein Elektron dieses Paares absorbiert die Energie, was bedeutet, daß das Dimer in einen angeregten Zustand versetzt wird und ein Elektron freisetzt. Es wird anschließend über ein Bakteriochlorophyll-Monomer auf ein Bakterio-Phaeophytin-Molekül übertragen (Zwischenakzeptor). Die Übertragungszeit des Elektrons vom Chlorophyll-Dimer zum Monomer ist mit 1psec extrem kurz. Der Elektronentransport vom Chlorophyll-Monomer zum Bakterio-Phaeophytin dauert ca. 20 psec. Von diesem Zwischenakzeptor gelangt das Elektron über ein Ubichinon, den primären Chinon-Akzeptor Q_A auf den sekundären Akzeptor Q_B .

Die Zeiten dieser Reaktionsschritte sind gemessen worden und im einzelnen in der Abbildung 2 dargestellt.

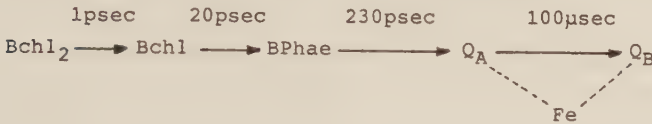


Abb. 2: Geschwindigkeit der einzelnen Elektronentransportschritte vom Chlorophyll-Dimer zum sec. Chinon-Akzeptor Q_B

Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, daß das Eisen entfernt werden kann, ohne daß sich dadurch die Kinetik des Elektronentransfers von Q_A nach Q_B wesentlich ändert.

Clayton erbrachte bereits 1962 durch ESR- und Absorptionsspektroskopie den Beweis, daß es sich bei Q_A um ein Ubichinon handeln muß, welches relativ fest gebunden ist und durch das Phaeophytin zum Q_A^- reduziert wird.

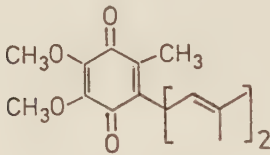
In der Nähe von Q_A befindet sich ein Fe^{++} -Ion, von dem man annimmt, daß es an der Stabilisierung von Q_A^- und möglicherweise auch von Q_B beteiligt ist (Wraight, 1982). Bei dem Sekundärakzeptor Q_B handelt es sich um ein weiteres Ubichinon-Molekül, das durch Q_A^- in zwei Schritten unter Protonisierung zum Ubichinol reduziert wird.

Nach einer Modellvorstellung soll das Ubichinon Q_B ein Molekül aus dem Chinon-Pool sein, das an seine Bindestelle im Reaktionszentrum tritt. Dort wird es bei einer ersten Lichtanregung des BChl über Q_A^- zum Semi-Chinon-Anion reduziert und ist nun fest an sein Protein gebunden. Die Proteinumgebung und möglicherweise auch das Fe^{++} -Ion sorgen für eine Stabilisierung des Semi-Chinon-Anion-Radikals.

In einem zweiten Schritt reduziert nun wiederum Q_A^- das Semichinon zu Q_B^{2-} .

Q_B^{2-} , das unter Protonisierung von der Bindestelle abdissoziiert, wird durch ein weiteres Ubichinon-Molekül aus dem Pool ersetzt.

Bei den Ubichinonen handelt es sich um p-Benzochinone mit jeweils 10 isoprenoiden Seitenketten (UQ-10 in Abb. 3).



Ubichinon (UQ-10)

Abb. 3: Aufbau des Ubichinons

Die folgende schematische Darstellung soll die cyclische photosynthetische Elektronentransportkette der Purpurbakterien darstellen.

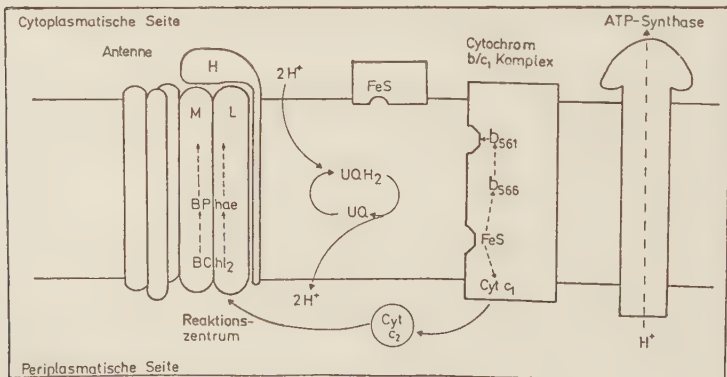


Abb. 4: Darstellung des photosynthetischen Elektronentransports der photosynthetischen Bakterien

Der Antennenkomplex (Abb. 4) absorbiert die Photonen und überträgt die Lichtenergie auf das Reaktionszentrum, welches wiederum den Redoxcarrier Ubichinon reduziert. Nach Aufnahme von zwei Protonen verläßt Ubichinon seine Bindestelle am Reaktionszentrum. Das Chinol wird auf der periplasmatischen Seite der Chromatophorenmembran durch den Cytochrom b/c_1 -Komplex oxidiert. Cytochrom c_2 gleicht das Elektronendefizit des Reaktionszentrums aus und wird seinerseits durch den Cytochrom b/c_1 -Komplex reduziert.

Der photosynthetische Elektronentransport führt bei Purpurbakterien zur Erzeugung eines Protonengradienten. In Chromatophorensuspensionen kommt es bei Belichtung zu einem Transport von Protonen in das Innere der Vesikel.

Das durch den Protonentransport in das Innere der Vesikel entstandene Protonenpotential stellt die treibende Kraft für die photosynthetische Phosphorylierung dar, bei der in der ATP-Synthase durch Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten aus ADP und Phosphat ATP gebildet wird.

Als erster Membranenkomplex überhaupt ist das Reaktionszentrum von Rhodopseudomonas viridis und später auch von Rhodobacter sphaeroides kristallisiert worden. Die Röntgenstrukturanalysen von Rhodopseudomonas viridis und Rhodobacter sphaeroides bieten die Möglichkeit, Aussagen über die räumliche Struktur zu machen und zu interpretieren (Michel, 1985).

Die Kristalle, welche Protein, Pigmente, Detergens, Wasser und anorganische Salze enthalten, wachsen bei Zimmertemperatur, werden aber für die Röntgenexperimente unter 0°C gehalten um ihre kristalline Struktur zu erhalten.

Die Größe eines Reaktionszentrums beträgt ca. $30 \times 70 \times 130 \text{ \AA}$ (Deisenhofer, 1984,85). Beim Kristallisierungsprozeß geht allerdings ein Großteil an sekundärem Akzeptor Q_B verloren.

Die Informationen aus den Röntgenstrukturanalysen ergeben gemeinsam mit den spektroskopisch gewonnenen Ergebnissen ein Bild vom Verhalten des photosynthetischen Reaktionszentrums und von den Prozessen, die das Elektron von einer Membranseite zur anderen transportiert (Youvan, 1987).

Als ein Beispiel sei noch eine Stereoabbildung gezeigt, die die Anordnung der Pigmente und Proteine von Rhodobacter sphaeroides darstellt (Abb. 5) (Allen et al., 1987).



Abb. 5: Stereobild der Reaktionszentrumsstruktur von Rhodo-
bacter sphaeroides)
 gelb = L-Untereinheit
 blau = M-Untereinheit
 grün = H-Untereinheit
 rot = Pigmente
 Abbildung b stellt das Reaktionszentrum um 90° gedreht
 dar

Der Komplex enthält 4 Hämgruppen, 4 BChl, 2 BPhae, ein Eisen, und ein Chinon, wobei 2 BChl ein eng assoziiertes Paar bilden. Die Acetyl-Gruppen der BChl-Ringe deuten wechselseitig auf die zentralen Magnesiumionen, welche wiederum an Histidinreste der Helices der L- und M-Untereinheit gebunden sind. Es stellen die Histidine L173 und M200 Protein-Liganden zum Magnesium-Atom des "special pair" des Chlorophylls dar.

Im Gegensatz zu Michel, der bei der Kristallisation des Reaktionszentrums von Rhodopseudomonas viridis den größten Teil des sekundären Akzeptors verlor, ist es Allen et al. 1987 bei Rhodobacter sphaeroides gelungen, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die Bindenische des Q_B Akzeptors zu lokalisieren. Nach Allen et al. liegt bei Rhodobacter sphaeroides der aromatische Ring des Trp M 252 zwischen den Ringen der beiden Cofaktoren Q_A und Q_B wobei die geringste Annäherung zum Chinon-Ring ca. 3-5 Å beträgt. Diese Struktur läßt die Vermutung zu, daß Trp M 252 eine wichtige Rolle beim Elektronentransport zwischen den beiden Akzeptoren spielen muß, da Michel Trp M 252 auch in Rhodopseudomonas viridis identifizieren konnte und die Abstände zwischen den Cofaktoren festlegte.

Zwischen den beiden Chinonen befinden sich ebenfalls die Imidazol-Ringe des His M 219 und His L 190 (in viridis sind es His M 217 und His L 190), die aufgrund ihrer Anordnung im Reaktionszentrum eine wichtige Funktion im Elektronentransport ausüben.

Die L- und M-Untereinheit der Reaktionszentren sind mit je 5 transmembranen Helices in der Membran verankert (Abb. 6). Zwei von ihnen steuern je ein Histidin zur Koordination des Nicht-Häm-Eisen bei und halten es somit in seiner Position.

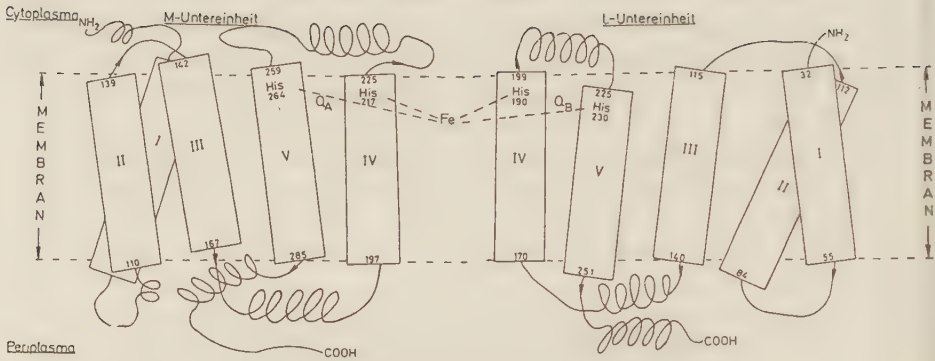


Abb. 6: Schematische Darstellung der transmembranen Helices der L- und M-Untereinheit der Reaktionszentren

Die H-Untereinheit ist im wesentlichen auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert. Im Unterschied zur L- und M-Untereinheit ist sie nur mit einer transmembranen Helix in der Membran verankert.

Die drei Untereinheiten L, M und H sind inzwischen aus vier photosynthetischen Bakterien sequenziert worden (Rhodospseudomonas viridis, Rhodobacter sphaeroides, Rhodospseudomonas capsulata und aurantiacus) (Michel et al., 1985, 1986, Williams et al., 1983, 1984, 1986, Youvan et al, 1984, Ovchinnikov, 1988, 1988b).

In der folgenden Tabelle 2 sind die Sequenzhomologien der verschiedenen Bakterien im Vergleich zueinander dargestellt und die Homologie ist in Prozentwerten angegeben.

Tab. 2: Sequenzhomologien der 3 Untereinheiten der Reaktionszentren im Vergleich zu anderen Bakterienarten, ausgedrückt in % (*)

	H:H	M:M	L:L
R. sphaeroides/R. capsulata	64	76	78
R. sphaeroides/R. viridis	39	50	59
R. capsulata/R. viridis	38	50	59

* Die Prozent Homologie wurde berechnet durch Division der Anzahl der homologen Aminosäuren mit der jeweils kürzeren Sequenz der beiden Proteine multipliziert mit 100

Bei höheren Pflanzen wird im Photosystem II ein 32 kDa Protein auch als Herbizid-Binde-Protein oder D_1 bezeichnet. Sowohl dieses D_1 -Protein aus dem PS II als auch die L-Untereinheit im bakteriellen Reaktionszentrum reagieren sehr sensibel auf verschiedene Hemmstoffe der Photosynthese.

Aufgrund dieser Tatsache und einiger Sequenzhomologien beider Proteine schloß man auf analoge Funktionen der Proteine in den verschiedenen Photosystemen. Daraus ergab sich ebenfalls die Vermutung, daß das D_2 -Protein im PS II mit der M-Untereinheit im bakteriellen Reaktionszentrum korrespondiert.

Um Aufklärung über einzelne Transportschritte beider Photosysteme zu erhalten, bedient man sich, wie bereits erwähnt, zahlreicher Hemmstoffe, die den Elektronentransport an verschiedenen Stellen zu hemmen vermögen.

So tritt zum Beispiel das Rezeptorprotein des Photosystem II in Wechselwirkung mit dem Inhibitor und verhindert so die Anbindung an Plastochinon aus dem Plastochinon-Pool (Velt-huys, 1974).

Durch die Röntgenstrukturanalyse wurden auch bereits die Bindungsstellen des Hemmstoffes Terbutryn (aus der Reihe der s-Triazingruppe) für das bakterielle Reaktionszentrum aufgeklärt (Michel et al. 1986b). Die Bindung beruht auf van der Waals Kräften zweier Wasserstoffbindungen des Terbutryns mit der Protein-Matrix.

Eine davon wurde zwischen einem Stickstoff aus dem Ring des Terbutryn als Akzeptor und der NH-Gruppe der Aminosäure L224 als Donor gefunden, während sich die andere Bindung zwischen der Serin-Seitenkette des L223 als Akzeptor und der Aminoethyl-Seiten-Kette des Terbutryn als Donor befindet.

Vom Photosystem II ist noch keine Röntgenstrukturanalyse bekannt. Allerdings kennt man durch DNA-Sequenzierung von Herbizid-resistenten Mutanten die Aminosäuren, die im D₁ an der Herbizidbindung beteiligt sind. Durch Photoaffinitätsmarkierung, proteolytische Spaltung und durch Sequenzierung ist weiterhin die Beteiligung von Tyr 237 und Tyr 254 an der Herbizidbindung nachgewiesen worden (Dostatni et al. FEBS LETTERS, 1988 im Druck).

Die Untersuchung der biologischen Aktivität von Hemmstoffen sowohl im bakteriellen System als auch im Photosystem II sollte weitere Hinweise auf die Architektur der Bindenische im Photosystem II geben.

Die bisher bekannten Hemmstoffe lassen sich in 3 Gruppen gliedern:

Hemmstoffe vom DCMU-Typ:

Namensgebend für diese Gruppe ist ihr wichtigster und bekanntester Vertreter selbst, das Diuron (DCMU).

Die wichtigsten Verbindungen sind z.B. Harnstoffe, Triazine, Triazinone, Anilide, Carbamate und Uracile, um nur einige von ihnen zu nennen.

Von ihnen sollen Atrazin (Triazin) und Metribuzin (Triazinon) als wichtigste Vertreter genannt werden.

Hemmstoffe vom Phenol-Typ

Diese Gruppe umfaßt Alkyl-, Nitro-, Halogen- oder Cyano-substituierte Phenole. (Trebst und Draber, 1979; Trebst et.al., 1979; Trebst, 1980)

Ihre bekanntesten Vertreter mit herbizider Wirksamkeit sind Dinoseb und Ioxynil.

Hemmstoffe vom Chinon-Typ

Diese Hemmstoffgruppe umfaßt Alkyl- und /oder Halogen-substituierte 1,4-Benzo-, 1,4-Naphthochinone und Anthrachinone, die die Reduktion von Plastochinon am PS II verhindern (Soll und Oettmeier, 1984; Oettmeier und Dostatni, 1987; Oettmeier et al. 1988).

Ein charakteristischer Vertreter ist das DBMIB (2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-1,4-benzochinon). (Trebst et al., 1970)

Zur Identifizierung von Hemmstoffbindestellen an Proteine bedient man sich der Photoaffinitätsmarkierungstechnik (Bayley, 1983).

In den Experimenten werden Hormon- oder Hemmstoff-analoga, radioaktiv markierte Verbindungen eingesetzt, die eine photolabile Gruppierung tragen. Diese wandelt sich bei Belichtung in ein Elektrophil um, das kovalent mit Nukleophilen in seiner Umgebung reagiert. Eine solche photolabile Gruppierung repräsentiert z.B. die Azido-Gruppe, bei der unter N_2 -Abspaltung ein elektrophiles Nitren entsteht, das mit der Rezeptorstelle reagiert. Azido-Atrazin war der erste Vertreter eines solchen PS II Hemmstoffes (Gardner, 1981).

Im Verlauf dieser Arbeit sollen weitere Hemmstoffklassen auf ihre Fähigkeit den Elektronentransport des bakteriellen Photosystems zu hemmen, getestet werden, um somit nähere Aufklärung über die Struktur der Bindestelle für die Inhibitoren zu gewinnen.

Weiterhin sollen Markierungsexperimente mit radioaktiv markierten photolabilen Hemmstoffen durchgeführt werden, um ihre Bindeproteine im bakteriellen Reaktionszentrum zu identifizieren.

2. Ergebnisse

2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Bakterien Rhodobacter sphaeroides

Schachmann, Pardee und Stanier (1952) konnten als erste den Nachweis erbringen, daß auch bei Purpurbakterien die an der Photosynthese beteiligten Pigmente an definierte Strukturen gebunden sind. Sie isolierten durch fraktionierte Zentrifugation aus zellfreien Extrakten von Rhodospirillum rubrum Partikel mit einem Durchmesser von ca. 600 Å.

In den folgenden Jahren wurden diese Befunde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Dünnschnitten bestätigt und auf Rhodobacter sphaeroides und verschiedene andere photosynthetische Bakterien ausgedehnt.

Diese Partikel, die Chromatophoren, können dabei als Bläschen vorliegen, wie bei Rhodospirillum rubrum und Rhodobacter sphaeroides, wobei die Bläschen untereinander durch feine Stränge zu einem Bläschen-Netz verbunden sein können (Drews und Giesbrecht, 1963).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit werden an vollständigen, nicht aufgeschlossenen Zellen durchgeführt und am Elektronenmikroskop Philips 410 untersucht.

Die Bakterien werden abzentrifugiert, anschließend mit Glutaraldehyd fixiert und mit Osmiumtetroxid kontrastiert. Nach mehreren Waschvorgängen mit Puffer und Ethanol werden sie in Beemkapseln mit dem Einbettungsharz VCD versetzt und polymerisiert.

Die für das Elektronenmikroskop benötigten Ultradünnschnitte werden am Mikroton mit einem Glasmesser geschnitten und auf formvar-beschichtete Kupfer-Netzchen gegeben. Die Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat erfolgt auf den Kupfer-Netzchen, welche somit für die Elektronenmikroskopie vorbereitet sind.

Bei einer weiteren Probe wurden die Bakterien vor der Fixierung mit dem Enzym Glucuronidase vesetzt um eine proteolytische Spaltung der in der Membran eingelagerten Kohlenhydrate zu erreichen. Die Kontrastierlösung kann dadurch besser in die Zelle eindringen. Somit sollen innere Strukturen besser erkannt werden.

Die untersuchten Bakterien sind längliche, am Ende abgerundete Gebilde, in deren Innerem einige Vakuolen zu erkennen sind (Abb. 7). Bei einer Vergrößerung um einen Faktor 110000 wird die Doppelmembran der Zellen gut aufgelöst, erscheint aber an einigen Stellen auffällig porös, was auf den proteolytischen Abbau der Kohlenhydrate durch Glucuronidase zurückgeführt werden könnte.

Die Chromatophoren im Zellinneren erscheinen als kleine bläschenförmige Gebilde, deren Feinstruktur jedoch durch die teilweise schlechte Kontrastierung nicht hinreichend aufgeklärt werden konnte.

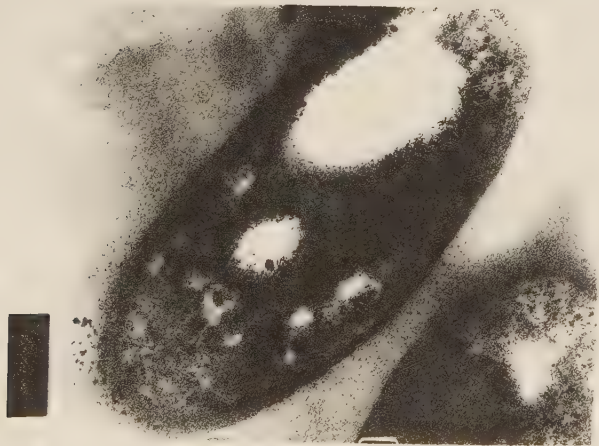
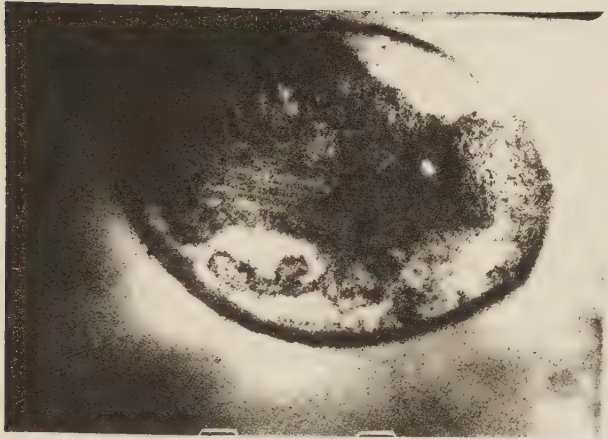


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bakterien Rhodobacter sphaeroides

2.2 Isolierung der Chromatophoren aus Rhodobacter sphaeroides

Durch Aufbrechen der intakten Zellen und durch Ultrazentrifugation aus dem Zellhomogenat isoliert man die Chromatophoren, welche die photosynthetischen Pigmente enthalten und den lichtinduzierten Elektronentransport durchführen (Laborvorschrift H. Scheer, München, mod. nach Jolchine, Husson, 1974). Sie besitzen eine Größe von 100nm. Ihre Absorptionsbanden liegen im Spektrum des sichtbaren Lichts und im Infrarotbereich.

In Abb. 8 ist das Spektrum der Chromatophoren mit der charakteristischen Absorption des B 800-850-Komplexes dargestellt. Der Vollständigkeit halber muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß das Spektrum in Abb. 8 je nach physikalischer Umgebung gering verschoben sein kann. Abb. 10 zeigt das Proteinmuster von Chromatophoren nach SDS-Gelelektrophorese, nachdem sie einer Detergensbehandlung mit SDS unterzogen wurden.

Um die Bakteriochlorophyllbestimmung vornehmen zu können, bedient man sich der spektralphotometrischen Messung nach Extraktion des Bakteriochlorophylls durch Aceton/Methanol bei 775nm (Clayton, 1966).

Das Absorptionsspektrum des BChl ist in Abb. 9 dargestellt.

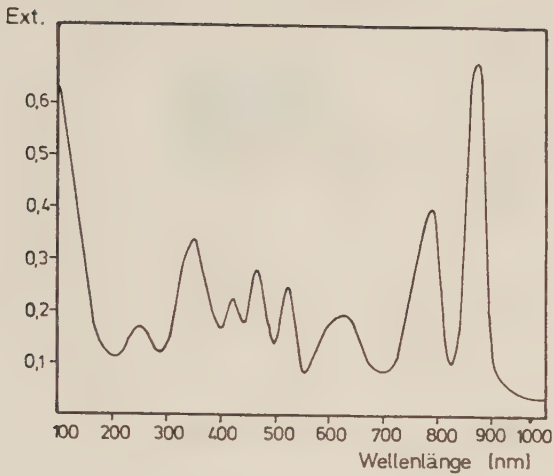


Abb. 8: Absorptionsspektrum isolierter Chromatophoren aus Rhodobacter sphaeroides

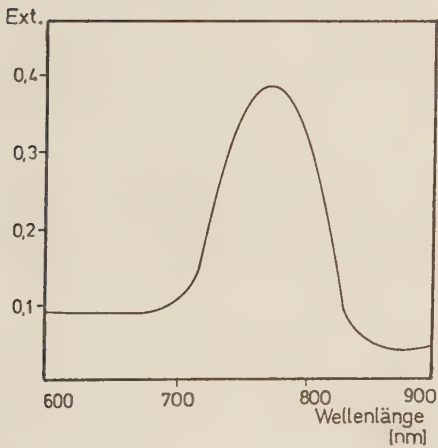


Abb. 9 : Absorptionsspektrum des Bakteriochlorophylls nach Aceton/Methanol Extraktion

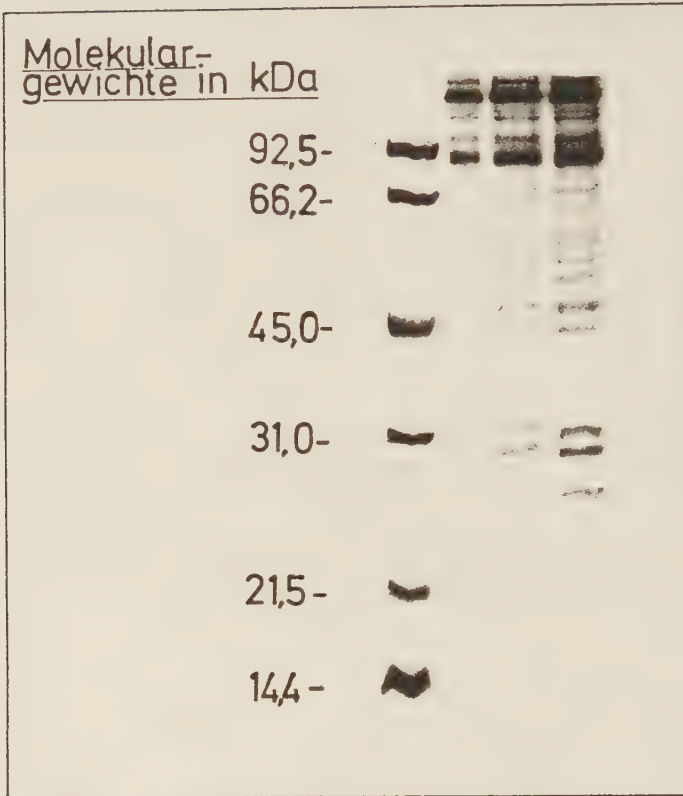


Abb.10: Proteinmuster der isolierten Chromatophoren nach SDS-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie-Reagenz

2.3 Messung der cyclischen Phosphorylierung in Chromatophoren aus Rhodobacter sphaeroides

Die Photophosphorylierung ist die lichtabhängige Bildung von ATP aus ADP und Phosphat. Das Licht liefert die Energie für den Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten durch den photosynthetischen Elektronentransport (Mitchell, 1961). Dieser Gradient wird durch die ATP-Synthase zur Bildung von ATP ausgenutzt.

Eine empfindliche Methode ist die ATP-Bestimmung mit Hilfe der Luciferase, die in dieser Arbeit Anwendung fand.

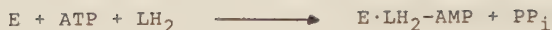
Es ist einleuchtend, daß die Leistung des lichtabhängigen Prozesses in erster Linie von der Strahlungsintensität abhängig ist. Mit Erhöhung der Lichtintensität nahm die Phosphorylierungsrate linear bis ca. 5000 lux zu, blieb dann konstant bis über 20000 lux, und erreichte somit einen Sättigungswert. Eine weitere Erhöhung der Lichtintensität vermochte die Photosyntheserate nicht mehr zu steigern.

Für die einzelnen Bestimmungen wurden im folgenden stets 20000 lux Lichtstärke gewählt.

Die Temperaturabhängigkeit wurde nicht eingehend untersucht, blieb aber bei den Versuchen mit 27°C - 28°C weitgehend konstant.

An dieser Luciferase (E) wird die Umsetzung des reduzierten Luciferins (LH_2) mit ATP zu einem Adenylat katalysiert, das unter Oxidation zur Lichtproduktion führt (Schlegel, 1981).

Diese Biolumineszenz wird ausgenutzt, um dann in einem sogenannten Luminometer die Lichtblitze mit einer Photozelle zu messen.



Die Signalstärke in mV ist proportional der Lichtintensität und damit proportional der Menge an gebildetem ATP.

Mit dieser Methode wird das gesamte ATP bestimmt und somit nicht nur ATP, welches über die ATP-Synthase, sondern auch ATP, das über die Adenylatkinase gebildet wird. Aufgrund der Tatsache, daß die Chromatophoren nicht genügend von verunreinigenden Enzymen befreit wurden, wurde eine relativ hohe Dunkelrate gemessen, die der Aktivität der Adenylatkinase zuzuschreiben ist (Majewsky, 1985). Die Dunkelrate lag bei maximal 30% der Rate im Licht. Die Dunkelrate wurde von den Meßwerten abgezogen.

Anhand dieses Meßprinzips sollen in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Hemmstoffe getestet werden, die in der Lage sind, die cyclische Phosphorylierung zu hemmen.

Die Hemmstoffe werden zu diesem Zweck in Konzentrationen zwischen 10^{-4} M bis 10^{-9} M zu der für die Phosphorylierung vorbereiteten Chromatophorenlösung gegeben. Dabei ist zu beachten, daß der Hemmstoff in Methanol gelöst ist, welcher sich ab einer bestimmten Konzentration ebenfalls hemmend auf das System auswirken könnte. In einer Versuchsreihe wurde diese Konzentrationsabhängigkeit näher untersucht und in Abb. 11 dargestellt.

Ab einem Gehalt von 1% Methanol, entsprechend einem Zusatz von 20 µl/2ml Probe nahm die Phosphorylierungsrate ab und Methanol selbst zeigte hemmende Eigenschaften.

Es wurde deshalb darauf geachtet, bei den folgenden Versuchen nie mehr als 1% Methanol im Ansatz zu haben. Um konstante Bedingungen für die cyclische Phosphorylierung zu schaffen, ist es notwendig, die Zeitabhängigkeit der Reaktion näher zu untersuchen.

Als maximale Belichtungsdauer wurden 30 min gewählt und anhand der in Abb. 12 dargestellten Kurve ergab sich eine Linearität der Phosphorylierung im Bereich von 0 - 30 min.

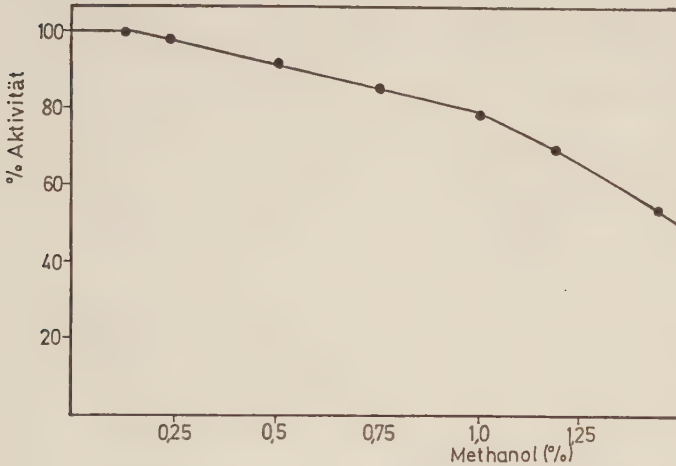


Abb. 11: Abhängigkeit der cyclischen Phosphorylierung in Chromatophoren aus Rhodobacter sphaeroides von der Methanolkonzentration

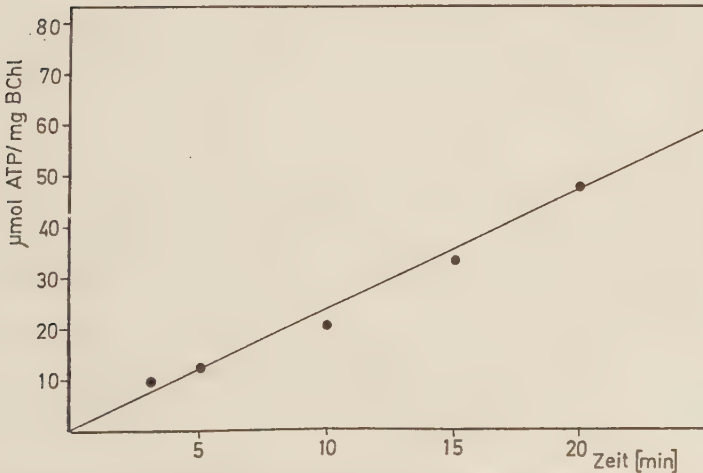


Abb. 12: Zeitabhängigkeit der cyclischen Phosphorylierung in Rhodobacter sphaeroides Chromatophoren. Die BChl-Konzentration betrug 31 μg.

Tab 3: Ermittelte pI_{50} -Werte verschiedener Hemmstofftypen durch Messung des ATP-Gehaltes nach der cyclischen Phosphorylierung

Substanz	pI_{50} -Wert
<u>1. Chinone</u>	
1.1 Benzochinone	
1.1.1 Chloranil	4.8
1.1.2 Bromanil	5.7
1.1.3 Jodanil	5.8
1.2 Naphthochinone	
1.2.1 2-Brom-3-n-butyl-Naphthochinon	4.0
1.2.2 2,3-Dibrom-Naphthochinon	4.3
1.2.3 2,3-Dijod-1,4-Naphthochinon	5.1
<u>2. DCMU-Typ Hemmstoffe</u>	
2.1 Terbutryn	6.1
<u>3. Phenol-Typ Hemstoffe</u>	
3.1 DNSJ	4.3
3.2 i-Dinoseb	4.1

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die 2,3,5,6-halogenierten 1,4-Benzochinone in der Lage sind das Photosystem der Bakterien zu hemmen. Ihre pI_{50} -Werte nehmen parallel zum Anstieg des Molekulargewichts der Halogen-Substituenten zu.

Die Naphthochinone zeigen im Vergleich zu den Benzochinonen eine geringere Hemmwirkung. Analog zu den Benzochinonen ist auch hier die beste Hemmwirkung beim Jod-halogenierten Naphthochinon zu verzeichnen.

Terbutryn, ein Hemmstoff aus der s-Triazin-Reihe, zeigt erwartungsgemäß einen sehr guten PI_{50} -Wert von 6.1. Er ist als bisher bester Hemmstoff für das bakterielle Photosystem beschrieben.

2.4 Bindungs- und Verdrängungsversuche mit radioaktiv markierten Hemmstoffen an Chromatophoren

Bindungsversuche an Chromatophoren geben Aufschluß über die Affinität und die Eigenschaften des jeweiligen Hemmstoffes für seine Rezeptorstelle (Tischer, Strotmann, 1977).

Bindungsexperimente wurden von Tischer, Strotmann bereits an isolierten Thylakoiden durchgeführt und sollen in dieser Arbeit auch auf Chromatophoren übertragen werden.

Die Experimente erlauben die Bestimmung der Bindungskonstanten K_B , die der Inhibierungskonstanten entspricht (extrapoliert auf eine Chlorophyll-Konzentration von 0), der Anzahl der Bindungsstellen x_t und der Anzahl der Chlorophyllmoleküle pro gebundenem Inhibitor-molekül. Letzteres ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Inhibitor-moleküle pro Elektronentransportkette.

Um die Affinität und die Eigenschaften des Inhibitors zu ermitteln, läßt man den radioaktiv markierten Hemmstoff in steigender Konzentration mit den Chromatophoren inkubieren und bestimmt anschließend die freie und die an die Chromatophoren gebundene Radioaktivität. Es besteht ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht zwischen freien, den besetzten Rezeptorstellen und dem Hemmstoff in Lösung (Soll, 1985).

Bei Bindungsexperimenten mit Chromatophoren stößt man allerdings auf größere Probleme als bei entsprechenden Versuchen mit Spinatthylakoiden, da sich die Thylakoide nach der Inkubationszeit mit dem Hemmstoff mit einer Tischzentrifuge pelletieren lassen, was bei Chromatophoren nicht ohne weiteres möglich ist, da sie lediglich eine Größe von 100 - 300 Å haben.

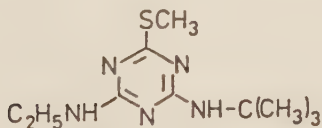
Zum einen fand eine Technik Anwendung, bei der die Chromatophoren über eine Nutsche abgesaugt und auf einer Membran zurückgehalten wurden. Diese Membran löst sich anschließend in der Scintillationsflüssigkeit auf. Die Fehlerwahrscheinlichkeit ist bei dieser Technik relativ groß, denn verbleiben auch nur geringe Mengen des Überstandes mit dem Hemmstoff an der Membran, erhöht sich die Radioaktivität der Chromatophoren, was fälschlicherweise zu einer Erhöhung der Chromatophoren-gebundenen Radioaktivität führt.

Aus diesem Grunde wurde zur Überprüfung eine zweite Methode benutzt, bei der die Chromatophoren in kleinen Zentrifugenröhrchen mit dem Inhibitor inkubiert und nach genau definierter Zeit abzentrifugiert (10min bei 216000 x g im Ausschwingrotor SW 60, Beckmann) werden.

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der in der Enzymkinetik angewandten speziellen Diagramme ermittelt. Im einzelnen handelt es sich hierbei um die Auftragungsweise nach Lineweaver-Burk, Woolf-Augustinsson-Hofstee und Scatchard (Tischer, Strotmann, 1977).

DCMU-Typ Hemmstoffe

1. Terbutryn (2-(1,1-Dimethylethylamino)-4-ethyl-6-methylthio-s-triazin)



Terbutryn

Das Bindungsexperiment wird mit $[^{14}\text{C}]$ markiertem Terbutryn durchgeführt. Die Bindungskurve läßt eine deutliche spezifische Bindung an die Chromatophoren erkennen (Abb. 13).

Aus dem nachfolgenden Diagramm, bei dem es sich um die Scatchard-Auftragung handelt, wird diese spezifische Bindung deutlich.

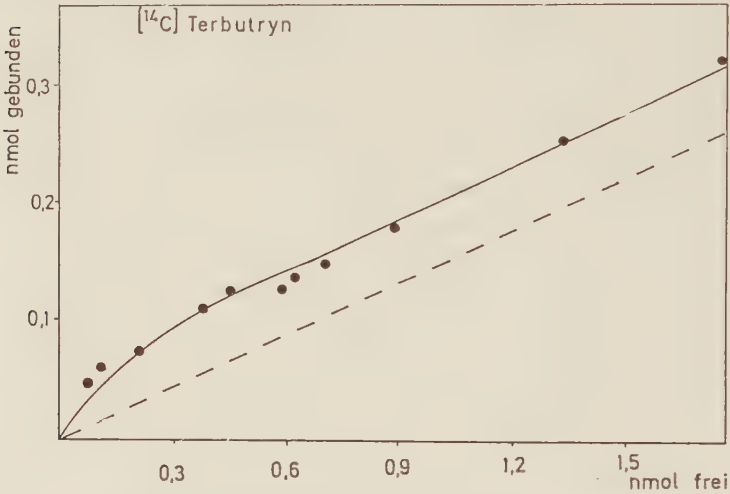


Abb. 13: Bindung von $[^{14}\text{C}]$ Terbutryn an Chromatophoren

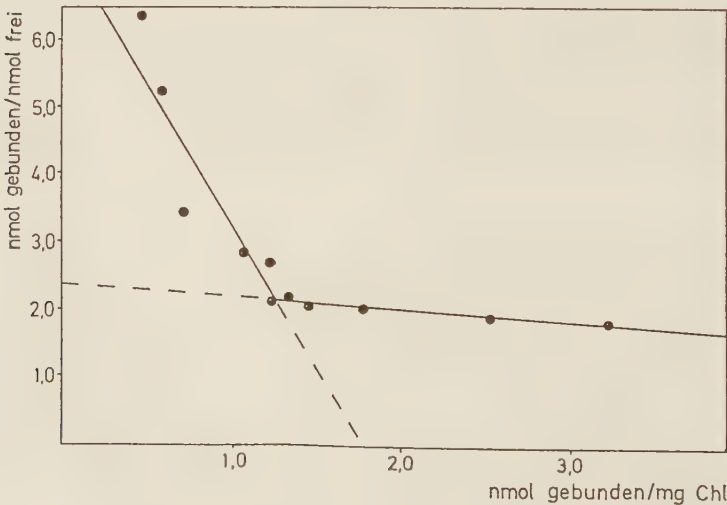


Abb. 14: Halb-reziprok aufgetragene Bindung nach Scatchard von $[^{14}\text{C}]$ Terbutryn an Chromatophoren

Bei der Bindungskurve kann man eine hochaffine (spezifische) von einer niedrigaffinen (unspezifisch) unterscheiden (Tischer, Strotmann, 1977; Oettmeier, Masson, 1980).

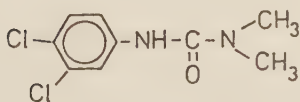
Die in den Chromatophoren gebundene Menge an radioaktiv markiertem Hemmstoff steigt dabei zunächst steil an, da der Inhibitor eine hohe Affinität zu seinem Rezeptorprotein besitzt. Sind alle Bindungsstellen mit Hemmstoffmolekülen abgesättigt, so bewirkt eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration allerdings noch eine geringe Steigerung der gebundenen Radioaktivität, da andere Proteine und Lipide den Hemmstoff unspezifisch binden.

Bindungsparameter wie Zahl der Bindungsstellen x_L , Bindungskonstante K_B und pK_B -Wert lassen sich berechnen und sind in der folgenden Tabelle Nr. 4 darstellt.

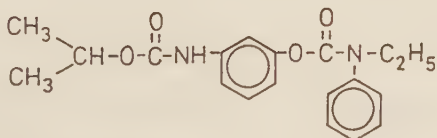
Tab. 4: Berechnete Werte der einzelnen Parameter für die Bindung von [14 C] Terbutryn an Chromatophoren

Substanz	Auftragung nach	Zahl d. Bindungsstellen nmol/mg Bchl	Moleküle Bchl/ Hemmstoff	Bindungs- konst. μ molar	pK_B -Wert	Korrelations- koeffizient d. Regression
Terbutryn	Lineweaver-Burk	11.8	94.1	0.25	6.59	0.98
	Woolf-Augustinsson-Hofstee	11.7	94.9	0.28	6.54	-0.95
	Scatchard	12.4	89	0.31	6.5	-0.95

2. DCMU und Phenisopham



DCMU = Diuron



Phenisopham

Beim $[^3\text{H}]$ DCMU selbst und einem weiteren Vertreter dieser Hemmstoffgruppe, dem $[^{14}\text{C}]$ Phenisopham (Biscarbamat) konnte eine spezifische Bindung nicht erkannt werden. Es werden lediglich beide Bindungskurven in Abb. 15 und 16 dargestellt. Beide Bindungskurven lassen erkennen, daß der Anteil des gebundenen radioaktiven Hemmstoffes linear von seiner eingesetzten Menge abhängig ist.

Bindungsparameter wie K_B , x_t und gebundene Moleküle Inhibitor/Moleküle Chlorophyll konnten nicht berechnet werden, da dies eine spezifische Bindung des Hemmstoffes an seine Bindeproteine voraussetzt.

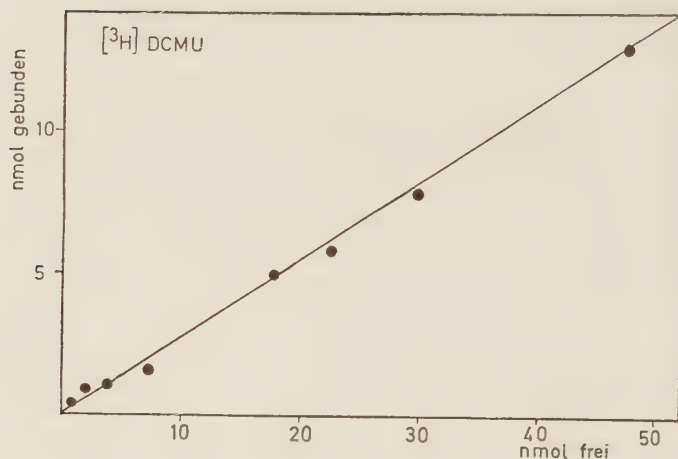


Abb.15 : Bindung von $[^3\text{H}]$ DCMU an Chromatophoren

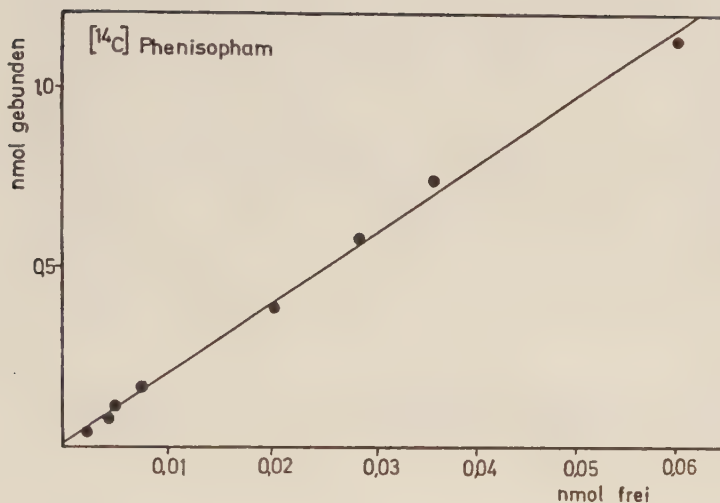
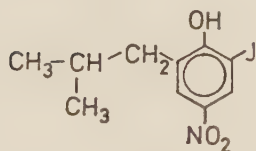


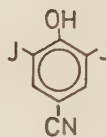
Abb. 16: Bindung von $[^{14}\text{C}]$ Phenisopham an Chromatophoren

Phenol-Typ Hemmstoffe

1. $[^3\text{H}]$ DNSJ
2. $[^{14}\text{C}]$ Ioxynil



DNSJ



Ioxynil

Als Vertreter der Phenol-Gruppe werden mit $[^3\text{H}]$ DNSJ und mit $[^{14}\text{C}]$ Ioxynil Bindungsexperimente durchgeführt, wobei bei DNSJ eine spezifische Bindung zu erkennen war, während Ioxynil lediglich unspezifisch an die Chromatophoren gebunden hat.

Die Bindungskurve von DNSJ und die Auftragungsweise nach Scatchard sind in den Abb. 17 und 18 dargestellt. Die berechneten Bindungsparameter zeigt Tab. 5.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm der DNSJ-Bindung ist zunächst nur eine einphasige Bindung zu erkennen, allerdings werden im Scatchard-Blot zwei Bindungsbereiche deutlich, wovon der eine Bereich der spezifische und der andere der unspezifische Anteil ist (Abb. 18).

Abb. 19 zeigt die Bindung von $[^{14}\text{C}]$ Ioxynil an Chromatophoren.

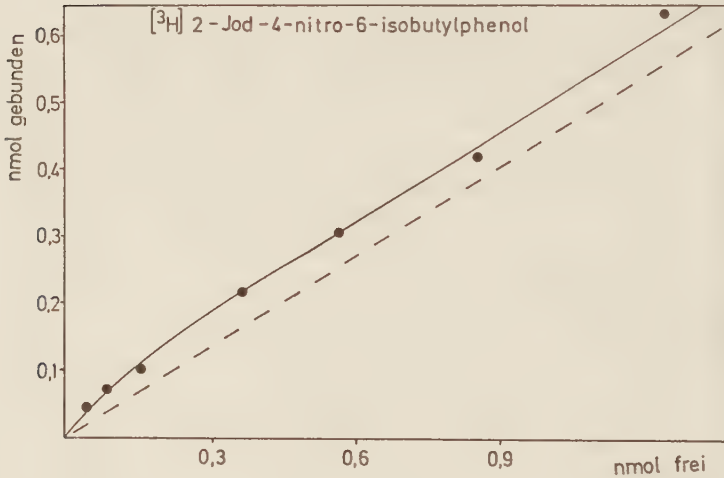


Abb. 17: Bindung von $[^3\text{H}]$ DNSJ an Chromatophoren

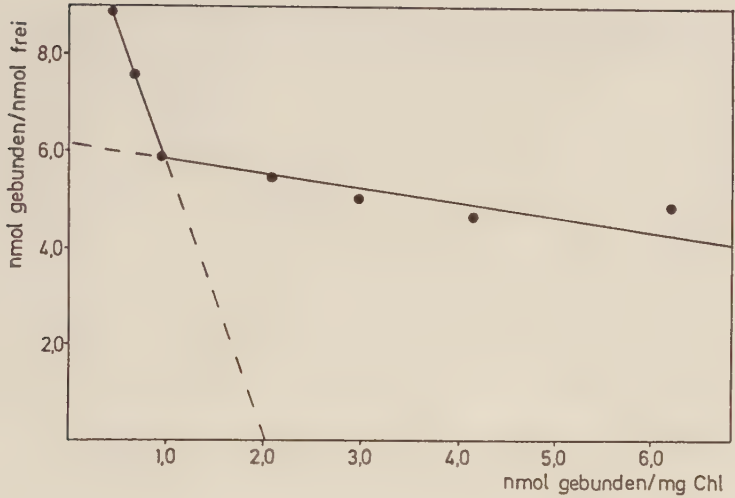


Abb. 18: Halbreziprok aufgetragene Bindung nach Scatchard von $[^3\text{H}]$ DNSJ an Chromatophoren

Tab. 5: Berechnete Werte für die einzelnen Parameter der Bindung von $[^3\text{H}]$ DNSJ an Chromatophoren

Substanz	Auftragung nach	Zahl d. Bindungsstellen nmol/mg BChl	Moleküle BChl/ Hemmstoff	Bindungs- konst. μmolar	pK_D -Wert	Korrelations- koeffizient d. Regrression
DNSJ	Lineweaver-Burk	4.86	228	0.24	6.61	0.99
	Wolf-Augustinsson-Hofstee	21.8	50.9	1.7	5.76	-0.85
	Scatchard	1.87	591	0.078	7.1	-0.99
	unspez. Bindung	28.8	38.4	2.37	5.6	-0.85
	spez. Bindung	1.87	591	0.078	7.1	-0.99

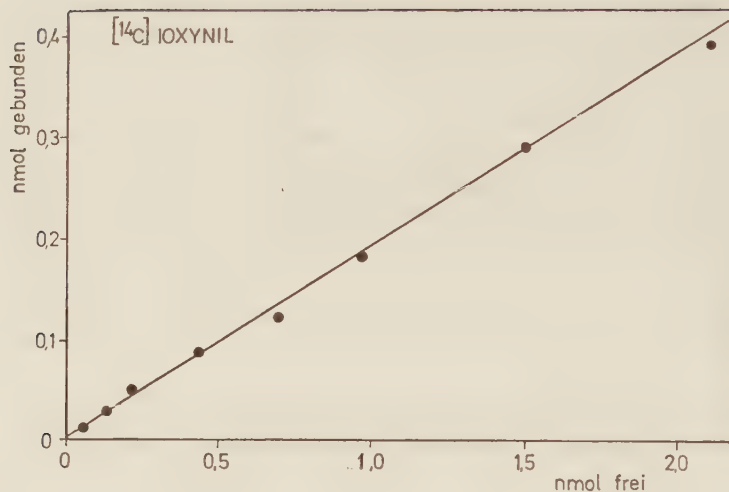
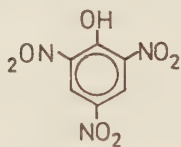


Abb. 19: Bindung von [¹⁴C] Ioxynil an Chromatophoren

[¹⁴C] Pikrinsäure



Pikrinsäure

Für Pikrinsäure kann ebenfalls keine spezifische Bindung nachgewiesen werden. Die Bindungskurve ist in Abb.20 dargestellt.

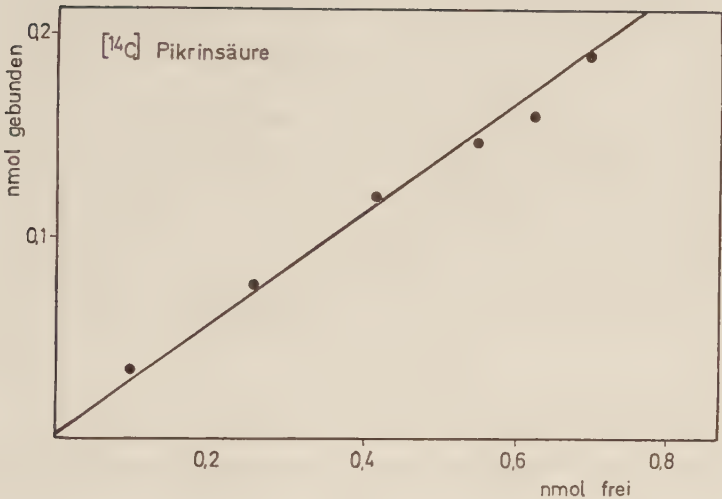


Abb. 20: Bindung von $[^{14}\text{C}]$ Pikrinsäure an Chromatophoren

Kompetitionsexperimente sollen im weiteren Verlauf der Untersuchungen nähere Aufschlüsse über die Bindungsstellen der Hemmstoffe liefern.

Im vorgestellten Experiment wurden Chromatophoren mit einer konstanten Menge an $[^{14}\text{C}]$ Terbutryn inkubiert und mit steigenden Konzentrationen an Azido-Atrazin (bis 10nmol) versetzt. Anhand der Abnahme der Radioaktivität ließ sich feststellen, daß Azido-Atrazin den Inhibitor Terbutryn von seinem Rezeptorprotein verdrängen kann.

Das Ergebnis eines solchen Kompetitionsexperimentes für die Verdrängung Terbutryn durch Azido-Atrazin ist in Abb. 21 dargestellt.

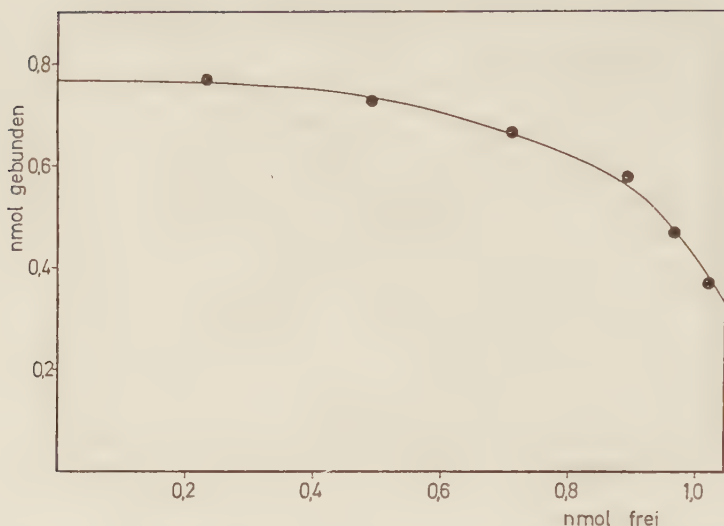


Abb. 21: Verdrängung des $[^{14}\text{C}]$ Terbutryn durch Azido-Atrazin an Chromatophoren von Rhodobacter sphaeroides

Ein ähnlicher Verdrängungsversuch wurde mit $[^{14}\text{C}]$ Bromanil und Terbutryn durchgeführt.

Hierbei ließ man den radioaktiv markierten Hemmstoff in steigender Konzentration mit den Chromatophoren inkubieren und gab anschließend eine konstante Menge an Terbutryn hinzu. Es wurden 3 Bindungskurven erstellt, wobei eine von ihnen eine Kontrollmessung war, die die Bindung von Bromanil an Chromatophoren zeigte (Zugabe von 0.1nmol - 10nmol).

Im gleichen Zusammenhang wurden in einem Bindungsexperiment die Chromatophoren jeweils erst mit dem radioaktiv markierten Hemmstoff versetzt und Terbutryn nach einer Inkubationszeit von 10 min im Überschuß dazugegeben (50nmol).

Im dritten Versuch wurden die Chromatophoren zuerst mit Terbutryn (50nmol) und anschließend mit steigenden Konzentrationen [^{14}C] Bromanil versetzt.

Es zeigte sich, daß die Bindungskurve des zweiten Versuchs (erst Bromanil anschließend Terbutryn) mit der Bindungskurve des Kontrollversuchs fast identisch war. Im dritten Experiment allerdings wies die Bindungskurve eine erheblich größere Steilheit auf, was darauf hinwies, daß wesentlich mehr Bromanil an die Chromatophoren gebunden war.

In Abb. 22 ist das Ergebnis der 3 Bindungsversuche dargestellt.

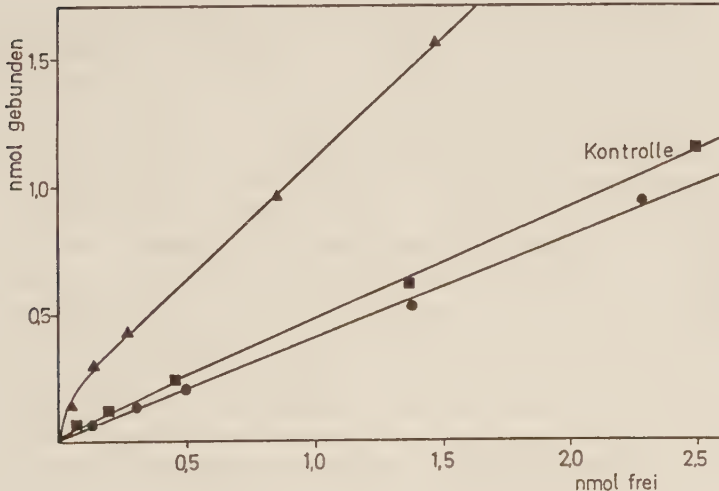


Abb. 22: Bindung von [^{14}C] Bromanil an Chromatophoren a) (■—■) Kontrolle, b) (●—●) 10 min Inkubation mit [^{14}C] Bromanil, dann Zugabe von 50nmol Terbutryn, c) (▲—▲) 10 min Inkubation mit 50nmol Terbutryn, dann Zugabe von [^{14}C] Bromanil

2.5 Isolierung von Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides

Durch die Behandlung mit dem Detergens LDAO werden die Reaktionszentren aus den isolierten Chromatophoren herausgelöst. Die Aufreinigung nach der Isolierung erfolgt über eine Diethylaminoethyl-Cellulose Säule (DEAE-52). Die Dissoziation mit LDAO und alle weiteren Schritte dürfen nur im grünen Sicherheitslicht durchgeführt werden (Reiss-Husson, 1974).

Bei der Reinigung der auf der DEAE 52-Säule absorbierten Reaktionszentren sollte die NaCl- Konzentration des Elutionsmittels nur langsam erhöht werden, um somit eine intensivere Reinigung von freien Pigmenten zu erzielen (erkennbar an der Bakteriochlorophyllbande bei 770nm).

Verunreinigungen in der 800-850nm Bande, d.h. ein zu hoher Anteil an Antennenpigmenten, läßt sich über die Säule nicht mehr reinigen und es empfiehlt sich eine neue Aufarbeitung. Die Verunreinigung mit Antennenpigmenten tritt auf, wenn die Kulturen ausschließlich unter Neonlicht wachsen, denn bei derartiger Anzucht konnten selbst nach dreimaliger Dissoziation mit LDAO keine Reaktionszentren präpariert werden.

Nach Elution der Reaktionszentren von der DEAE 52-Säule und Dialyse über Nacht werden diese an einer Minisäule oder über eine Membran konzentriert, sowie ihr Absorptionsspektrum bestimmt, welches in Abb.23 dargestellt ist. Die Abnahme der Bande im 850nm Bereich deutet auf einen geringen Anteil des Antennen-Bakteriochlorophylls hin. Die 760nm-Bande gibt das Absorptionsmaximum des Bakteriochlorophylls wieder.

Das Proteinmuster der Reaktionszentren nach SDS-Gelelektrophorese zeigt Abb. 24. Im Bereich um 28 kDa erkennt man deutlich die H-Bande, das "heavy"-Protein. Es schließt sich die M-Untereinheit ("medium") mit 24 kDa und die L-Untereinheit ("light") mit 22 kDa an.

Die Verunreinigung im Bereich um 43 kDa ließ sich auch nach dreimaligem Waschen nicht entfernen. Hierbei handelt es sich um Polypeptide aus der Zellwand, die sich allerdings im Verlauf weiterer Experimente nicht störend auswirkten.

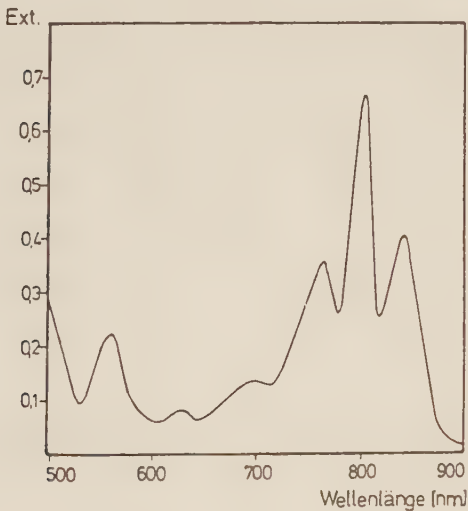


Abb. 23: Absorptionsspektrum isolierter Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides

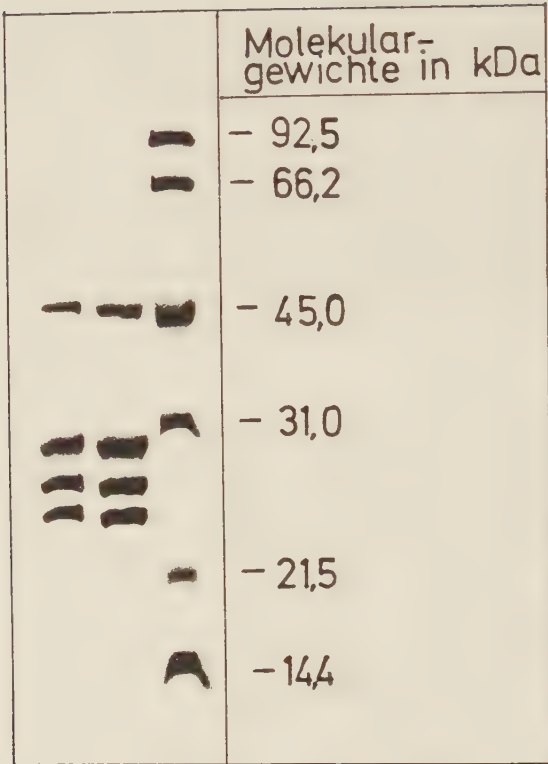
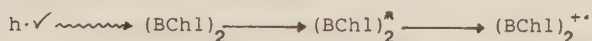


Abb. 24: Proteinmuster der Reaktionszentren von *Rhodospirillum rubrum* nach SDS-Page. Die Molekulargewichte beziehen sich auf den Proteinstandard

2.6 Elektronen-spin-Resonanz (ESR)

Es handelt sich bei dieser Methode um eine selektive Absorption von elektromagnetischer Strahlung in paramagnetischen Substanzen durch Übergänge von Elektronenspins zwischen verschiedenen Energieniveaus im magnetischen Feld.

Es wird hier die Eigenschaft des freien $\text{BChl}_2^{+\cdot}$ -Radikals ausgenutzt, da sich das "special pair" des Bakteriochlorophylls im Licht im paramagnetischen Zustand befindet.



Durch die Energie des eingestrahlten Lichtes entsteht ein $\text{BChl}_2^{+\cdot}$ -Radikal durch Abspaltung eines Elektrons. Es bleibt ein ungepaartes Elektron zurück, welches einen eigenen Spin aufweist und somit einen Drehimpuls um die eigene Achse besitzt. Damit verknüpft ist ein magnetisches Moment, das sog. Spinnmoment. Dieses entstandene $\text{BChl}_2^{+\cdot}$ -Radikal zeigt ein ESR-Signal mit einer Linienbreite von 10.6 Gauss, dessen Form und g-Wert mit dem in der Literatur beschriebenen identisch ist (Abb. 25) (Feher et al., 1972).

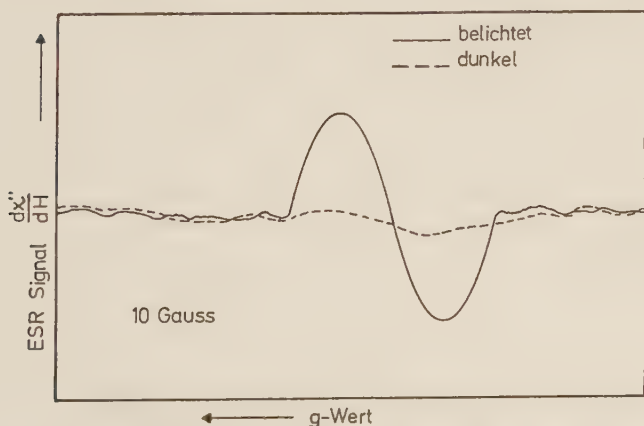


Abb. 25: Das lichtinduzierte ESR-Signal der Reaktionszentren von Rhodospirillum rubrum sphaeroides

In der Dunkelheit ist kein Signal zu erwarten, da sich Bakteriochlorophyll in diesem Fall in einem diamagnetischen Zustand befindet. Im durchgeführten Versuch konnte dies bestätigt werden.

In der gleichen Versuchsreihe wurde die Licht-Dunkel-Kinetik untersucht. Sobald die Reaktionszentren belichtet wurden, war ein sprunghafter Anstieg des Signals zu erkennen (Abb. 26). Da die Zeit dieser Reaktion extrem kurz ist, konnte sie unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht mehr aufgelöst werden (Marinetti et al., 1979). Wurde das Licht ausgeschaltet, ging das Signal auf das Anfangsniveau zurück.

Dieser Versuch konnte beliebig oft wiederholt werden und bewies somit die photochemische Aktivität der isolierten Reaktionszentren.

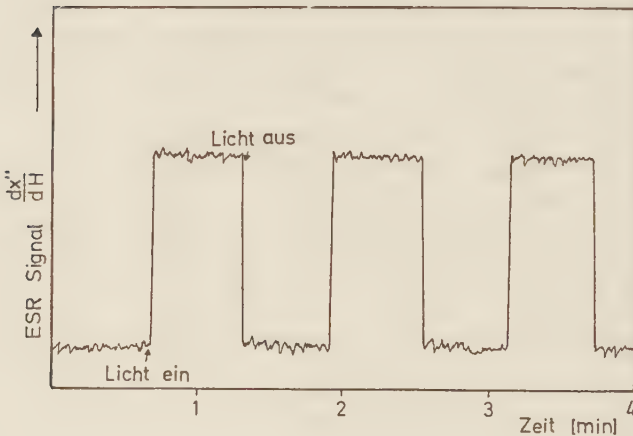


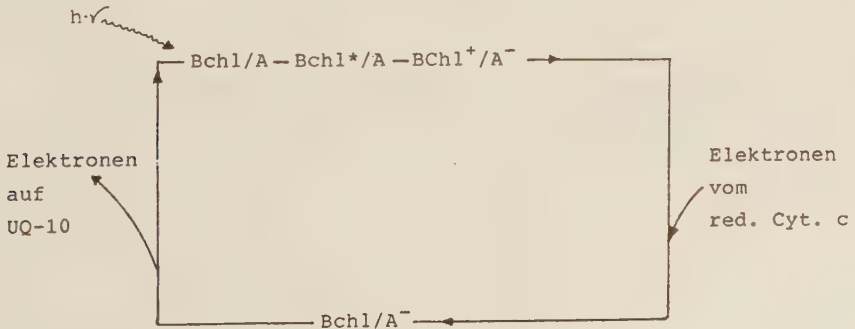
Abb. 26: Darstellung des Signals der Hell-Dunkel-Kinetik bei Reaktionszentren von Rhodobacter sphaeroides

2.7 Ein Testsystem für "steady-state" Elektronentransport im Reaktionszentrum

Im Laufe dieser Arbeit sollte ein System zur Untersuchung des "steady-state" Elektronentransports im Reaktionszentrum aufgestellt und die Eigenschaften der beteiligten Akzeptoren näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde folgendes Elektronentransportsystem entwickelt:

Photosynthetisch aktiven Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides wird reduziertes Cytochrom c als Elektronendonator und Ubichinon UQ-6 als Elektronenakzeptor zugegeben und unter anaeroben Bedingungen die lichtinduzierte Oxidation des Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen und aufgezeichnet. Dieser Elektronentransport wird im Meßsystem mit Dauerlicht senkrecht zum Meßlicht (Querbelichtung) gemessen. Im früheren Arbeiten wurde diese Cytochrom c Oxidation immer nur kurzzeitig in Form von Lichtblitzen bestimmt (Clayton, 1972).

In Anwesenheit eines Elektronendonors, des reduzierten Cytochrom c und eines Elektronenakzeptors, des UQ-6 läßt sich der Elektronentransport folgendermaßen darstellen:



Die Meßansätze werden in Küvetten vorbereitet, in die Puffer, die Reaktionszentren, Ubichinon und zuletzt das red. Cytochrom c zugegeben werden. Sie werden unter ständiger Begasung mit Argon sauerstofffrei gehalten, um eine Oxidation des Cytochroms zu verhindern. Abb. 27 zeigt die Aufzeichnung der Messungen des Elektronentransportsystems einmal ohne UQ-6, als weiteres ohne Cytochrom und den Verlauf des kompletten Systems. Es wird deutlich, daß ohne den Elektronenakzeptor UQ-6 und ohne den Elektronendonator Cytochrom c kein Elektronentransport stattfindet, während bei Zugabe aller beteiligten Substanzen eine Aktivität zu verzeichnen ist.

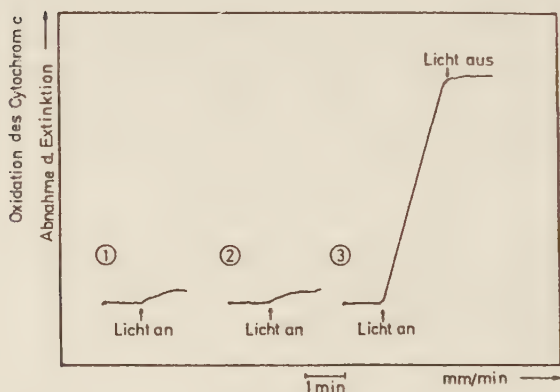


Abb. 27: Elektronentransportmessung an isolierten Reaktionszentren 1. ohne Ubichinon, 2. ohne red. Cytochrom c, 3. mit Ubichinon und mit red. Cytochrom c

2.8 Entfernung des Chinons der Reaktionszentren mittels Säulenextraktion

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich die Chinonakzeptoren Q_A und Q_B erheblich in der Festigkeit ihrer Bindung zum Rezeptorprotein. Der primäre Chinonakzeptor Q_A ist fester mit der M-Untereinheit verankert als der sekundäre Akzeptor Q_B mit der L-Untereinheit. Letzterer kann durch Extraktion aus den Reaktionszentren entfernt werden. Allerdings kann das fest an seine Untereinheit gebundene Chinon Q_A unter schärferen Bedingungen ebenfalls extrahiert werden.

Durch Messung der photosynthetischen Aktivität kann gezeigt werden, daß ca. 90 % von Q_B entfernt werden muß, um 50% Aktivitätsverlust zu erhalten (aus: The Photosynthetic Bacteria, Clayton, Sistrom, 1978). Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit der Ubichinone für die Elektronentransfer-Reaktionen.

Rekonstitutionsversuche haben gezeigt, daß durch Zugabe von Ubichinon oder Phyllochinon (Vitamin K_1) die volle photosynthetische Aktivität wiederhergestellt werden kann.

Die folgende Methode nach Okamura wurde nach Gunner modifiziert. Danach kann eine Entfernung von ca. 90 % Chinon erzielt werden. (Gunner et al.)

Eine DEAE-52 Säule wird mit Rinderserumalbumin (RSA) vorgewaschen. Mit einer hohen Natriumchlorid-Konzentration wird RSA anschließend wieder von der Säule eluiert. Dieser Schritt wird angewandt um die nicht-ionischen Bindungsstellen des DEAE-52 abzusättigen, welche die Proteine irreversibel binden würden. Zum anderen verbessert man mit diesem Schritt die Elution der hydrophoben Proteine.

Die Reaktionszentren werden mit dem Säulenmaterial dispergiert und auf die Säule aufgetragen. Dadurch kommt es zu einer Verbesserung der Effektivität beim Waschen während der Chinon-Extraktion.

Im Elutionspuffer sind Dithiothreitol, LDAO, und o-Phenanthrolin enthalten, welche die Chinone Q_A und Q_B reduzieren und somit ihre Entfernung erleichtern. Zusätzlich wird auch das Bakteriochlorophyll-Dimer vor Oxidation während der Chinon-Extraktion geschützt. Die Extraktion wird bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt was zu einer 90-95%igen Entfernung der Chinone innerhalb von 2 Stunden führt.

Die Reaktionszentren werden anschließend wie gewohnt von der Säule eluiert, dialysiert und anschließend ihre Aktivität bestimmt. Ihre Aktivität beträgt noch ca. 25% der ursprünglichen Aktivität. Das deutet darauf hin, daß UQ-10 zum größten Teil aus den Reaktionszentren extrahiert werden konnte.

Tab. 6: Darstellung des Verbrauchs an red. Cytochrom c in $\mu\text{Mol/Stunde}$ vor und nach der Extraktion des Chinons.

	vollständige Reaktionszentren	Chinon-extrahierte Reaktionszentren
Verbrauch an red. Cyt.c in $\mu\text{Mol/h}$	71	ca. 17
Angaben des Verbrauchs in %	100	ca. 25

2.9 Proteolytische Spaltung der Chromatophoren und Reaktionszentren mit Trypsin und V_8 -Protease

Um weitere Erkenntnisse über den Aufbau des Reaktionszentrums zu erhalten, wurde ihr Verhalten gegenüber den proteolytischen Enzymen Trypsin und V_8 -Protease untersucht.

Die Eigenschaften beider Enzyme in Bezug auf ihr pH-Optimum, ihre Temperaturabhängigkeit und ihre Reaktionsgeschwindigkeit sind ähnlich. Der Unterschied zwischen beiden Enzymen besteht nur in ihrer Spezifität die Proteine an bestimmten Stellen zu spalten.

Trypsin erkennt seine Spaltstellen jeweils vor den Aminosäuren Arginin oder Lysin, während V_8 -Protease vor Asparaginsäure oder Glutaminsäure spaltet.

Sowohl bei den Chromatophoren, als auch bei den Reaktionszentren wurde die proteolytische Spaltung bei Raumtemperatur und im pH-Bereich 7-8 vorgenommen.

Beide Enzyme wurden jeweils 30 min mit der Proteinklösung inkubiert, wobei allerdings die Reaktion nach Beendigung der Spaltung nicht durch Protease-Inhibitoren, wie z.B. PMSF oder Trypsin-Inhibitor gestoppt wurde.

Unmittelbar nach der Proteolyse wurde die gesamte Lösung im Solubilisierungsmedium für die gelelektrophoretische Auftrennung aufgenommen und auf einem Polyacrylamidgel mit hoher Quervernetzung (nach Schagger et al., 1985) aufgetrennt. Dieses Gelsystem erlaubt eine gute Auftrennung auch sehr kleiner Bruchstücke und läßt sie nach Anfärbung als scharfe Banden sichtbar werden.

In Abb. 28 ist die proteolytische Spaltung der Chromatophoren dargestellt und es wird deutlich, daß die H-Untereinheit mit 28 kDa schon bei niedriger Enzym-Konzentration gespalten

wird und verschwindet. Dann folgt die 22 kDa-Untereinheit, die L-Untereinheit, während die M-Untereinheit zuletzt bei einer Konzentration von über 70 µg gespalten wird.

Parallel dazu reichern sich die Proteinbanden im Gel in den niederen Bereichen stark an; jedoch kann eine Zuordnung der einzelnen Bruchstücke zu ihrem ursprünglichen Protein erst erfolgen, wenn das Protein entweder radioaktiv markiert ist, oder es sich um ein isoliertes Protein handelt.

Der Nachteil bei der proteolytischen Spaltung mit Trypsin besteht darin, daß Trypsin selbst im Gel mit steigender Konzentration intensive Bande gibt. Sie können die eigentlichen Bruchstücke der Proteine überdecken und eine Identifizierung erschweren.

Es wurde daher bevorzugt mit V_8 -Protease gearbeitet, da diese nur 2 Protein-Banden im Bereich um 40 kDa aufweist, was eine bessere Analyse der entstandenen Bruchstücke erlaubt.

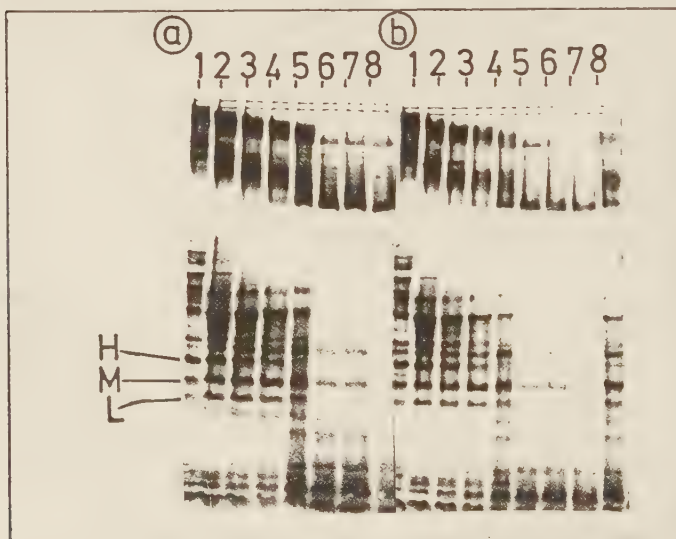


Abb. 28: Photographie eines Gels nach Schagger et al. 1985 nach proteolytischer Spaltung mit V_8 -Protease
 a) 1= Chromatophoren, 2-8= Zugabe steigender Konzentrationen an V_8 -Protease (1µg, 5µg, 10µg, 25µg, 50µg, 100µg)
 b) 1= Chromatophoren, 2-8= wie unter a)

Analog zum Photosystem II der grünen Pflanzen wird im folgenden Experiment die Hemmbarkeit des Proteinabbaus durch Trypsin nach vorangehender Behandlung mit Terbutryn als wirkungsvollem Hemmstoff eingehend untersucht.

Im Photosystem II der grünen Pflanzen erfährt das 32 kDa-Protein, welches auch als Herbizid-Binde-Protein bezeichnet wird, nach Terbutryn-Behandlung durch Trypsin keine Spaltung mehr und erweist sich somit als geschützt (Trebst et al., 1988 im Druck).

An dieser Stelle wird analog zum PS II der Versuch mit Terbutryn-behandelten Reaktionszentren durchgeführt, wobei die eingesetzte Menge an Terbutryn weit über dem eigentlichen pI-50 Wert des Inhibitors liegt.

Wie bereits durch Photoaffinitätsmarkierungsexperimente ermittelt werden konnte, kommt nur die L-Untereinheit als Rezeptorprotein für Terbutryn in Frage (Stein et al., 1984).

Nach Zugabe von 10^{-5} molarer Terbutrynlösung und einer Inkubationszeit von 5 min wird die tryptische Spaltung der Reaktionszentren wie bereits beschrieben, durchgeführt.

Es zeigt sich jedoch nach der tryptischen Verdauung kein Unterschied ob Terbutryn anwesend ist oder nicht. Es wird wie vorher zuerst die H-Untereinheit, dann L und zuletzt M gespalten. Terbutryn vermag also die L-Untereinheit nicht vor dem Abbau zu schützen. Somit unterscheidet sich das bakterielle Reaktionszentrum deutlich vom Photosystem II (Abb. 29).

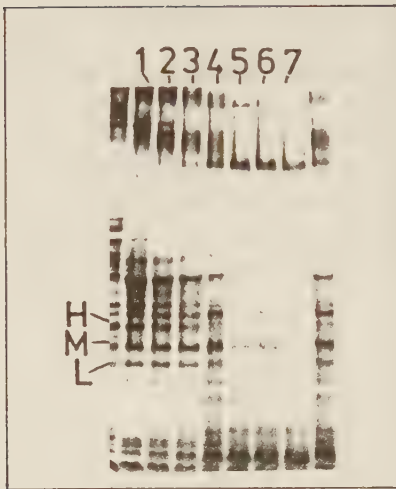


Abb. 29: Photographie eines SDS-Gels nach Spaltung der Chromatophoren mit Trypsin nach vorangegangener Terbutryn-Behandlung
 1-7= Terbutryn-behandelte Chromatophoren ($10^{-5}M$)
 Zugabe steigender Konzentration an Trypsin
 ($1\mu g$, $5\mu g$, $10\mu g$, $25\mu g$, $50\mu g$, $75\mu g$, $100\mu g$)

2.10 Isolierung der H-Untereinheit aus Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides

Ziel der Versuche war es herauszufinden, in wieweit die H-Untereinheit die Reaktionen des Reaktionszentrums beeinflusst, und welche Folgen nach Verlust der H-Untereinheit auftreten. Zum anderen sollte die H-Untereinheit sauber isoliert werden um später dagegen Antikörper herzustellen.

In bereits publizierten Methoden, in denen als chaotrope Substanzen entweder sowohl SDS oder LiDS, als auch Triton-X-100 und Harnstoff bei alkalischem pH-Wert Anwendung fanden, wird im folgenden nach Debus et al. (1985) Lithiumchlorat eingesetzt.

Die Reaktionszentren, die mit Hilfe der Membrantechnik konzentriert und auf eine optische Dichte von 12 - 15 eingestellt wurden, schichtet man vorsichtig auf eine Lithiumchlorat-Lösung und zentrifugiert diese 5 Stunden bei 65000 rpm (250000 x g im Vertikalrotor RP 67 VF LKB). Die H-Untereinheit kann bei dieser Methode mit einer 95%igen Reinheit gewonnen werden.

Genauen Aufschluß darüber gibt die Auftrennung der Proteine mit der SDS-PAGE, wonach nur noch sehr geringe Spuren von der L- und der M- Untereinheit in der H-Fraktion zu erkennen sind. Die H-Untereinheit enthält noch einige Pigmente (ca. 0.1 Tetra-Pyrrol / H und Q-10 (0.5 Q-10 / H)).

Es wird vermutet, daß sich noch einige nichtspezifische Akkumulate des Detergens an der Spitze der Zentrifugenröhrchen ansammeln, die zusammen mit der H- Untereinheit isoliert werden.

Es werden insgesamt 5 Fraktionen entnommen, wobei die letzte Fraktion im Zentrifugenröhrchen fast ausschließlich den L/M-Komplex enthält (siehe Abb.: 30).



Abb. 30: Darstellung der einzelnen entstandenen Fraktionen nach Zentrifugation der Reaktionszentren auf Lithiumchlorat im Vertikalrotor

Die LM-Fraktion ist durch die assoziierten Chlorophylle an der grünlichen Farbe gut zu erkennen und kann separat aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen werden. Die Fraktion, welche die H-Untereinheit enthält, ist nur sehr schwach oder gar nicht gefärbt und der Gehalt an Protein kann ausschließlich über die Extinktion bei 280nm bestimmt werden.

Die H- und die L,M-Fraktion werden getrennt über Nacht dialysiert, um das Lithiumchlorat zu entfernen und eingefroren.

2.11 Messung der Aktivität eines Komplexes der L- und M-Untereinheit

Die gewonne L,M-Fraktion aus der H-Isolierung wird auf deren photosynthetische Aktivität und deren Hemmbarkeit mit Terbutryn hin untersucht.

Durch die Isolierung mit der o.a. Methode erhält man die L- und M- Untereinheit mit einem Gehalt von ca 0.5 H / L,M. Eine ähnliche Sauberkeit erzielt man z.B. mit dem Detergens LDAO oder CHAPS; die größte Kontamination von L,M mit H bewirkt Triton-X-100.

Die Messung erfolgt, wie bereits beschrieben, über die Oxidation des reduzierten Cytochrom c, am Spektralphotometer (Zeiss) mit Querbelichtung.

Die Aktivität der L,M-Fraktion betrug noch ca. 65 % der normalen Aktivität vollständiger Reaktionszentren. Die Hemmung des Elektronentransports durch Terbutryn nahm mit dem Entfernen der H-Untereinheit ebenfalls ab.

Tab. 7: Darstellung der Abnahme der Aktivität der Reaktionszentren nach Entfernung der H-Untereinheit anhand des Verbrauchs an red. Cyt c/h

Verbrauch red. Cyt.c/h bei vollst. Reaktionsz. in μMol	in %	Verbrauch red. Cyt.c/h bei H-Untereinheit befreiten Reaktionsz. in μMol	in %
71	100	46	65

Der pI_{50} -Wert für Terbutryn, bestimmt an vollständigen Reaktionszentren, beträgt 6.25. Bei wiederholter Messung mit der L- und M-Untereinheit, d.h. von der H-Untereinheit befreiten Reaktionszentren wurde lediglich ein pI_{50} -Wert von 4.2 ermittelt.

2.12 Proteolytische Spaltung der H-Untereinheit mit V_8 -Protease

Die durch Zentrifugation isolierte H-Untereinheit aus Reaktionszentren wird über Nacht gegen Tris-Puffer dialysiert um überschüssiges Lithiumchlorat zu entfernen. Von dieser Proteinlösung wird durch spektralphotometrische Messung bei 280nm die Konzentration bestimmt und für die anschließende proteolytische Spaltung mit V_8 -Protease eingesetzt.

Eine Konzentrierung der Lösung mittels Vakuumzentrifugation, oder Gefriergetrocknung konnte nicht vorgenommen werden, da es selbst durch Silanisierung der Gefäße nicht gelungen ist, dieses Protein in Lösung zu halten. Die nach der Konzentrierung durchgeführte PAGE ließ dieses Ergebnis deutlich werden, denn es erschienen keine konzentrierten Banden auf dem Gel.

Die proteolytische Spaltung der H-Untereinheit zeigte zahlreiche Banden im Bereich unter 28 kDa. Da V_8 -Protease vor den Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure spaltet, sollten theoretisch 27 einzelne Bruchstücke entstehen, von denen einige allerdings auf dem Gel nicht zu sehen sein können, da sie nur 1-5 Aminosäuren lang sind, was einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 120-600 entspricht.

Die größten entstandenen Spaltstücke umfassen ca. 22 - 35 Aminosäuren, entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 2500-5000 kDa.

Abb. 31 zeigt die Photographie eines SDS-Gels nach Spaltung der H-Untereinheit mit V_8 -Protease.

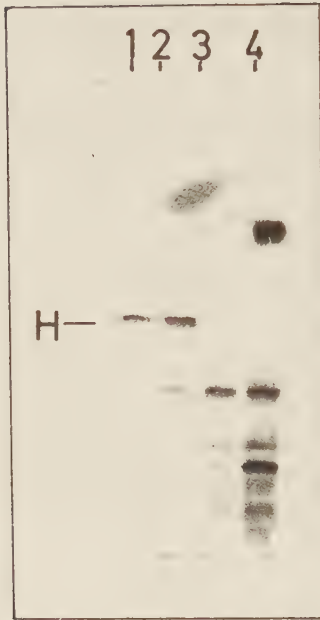


Abb. 31: Photographie eines SDS-Gels nach Spaltung der H-Untereinheit mit V_8 -Protease
1 = H-Untereinheit isol., 2 = H + 0.75 μ g V_8 -Protease
3 = H + 2 μ g V_8 -Protease, 4 = H + 5 μ g V_8 -Protease

2.13 Herstellung von Antikörpern gegen die H-Untereinheit der Reaktionszentren

Antikörper sind wertvolle Werkzeuge für die Untersuchung der Struktur von Proteinen, deren Abbau und deren Verhalten gegenüber Hemmstoffen (Berzborn, 1980).

Im vorliegenden Kapitel wird die Herstellung von Antikörpern gegen die H-Untereinheit der Reaktionszentren beschrieben. Die H-Untereinheit wird nach der o.a. Methode isoliert, dialysiert und auf einen Gehalt von 1mg Protein/ml eingestellt.

Den für die Immunisierung verwendeten Kaninchen wird vor der ersten Injektion mit dem Antigen Kontrollblut zur Bestimmung des 0-Serums entnommen. Nach 4 - 6 Wochen kann das erste Serum mit dem Western-Blot-Verfahren auf den Titer des Antikörpers getestet werden. Sollte die Antigen-Antikörper-Reaktion noch negativ sein, wird erneut immunisiert. Das nach weiteren 4 Wochen erhaltene Kontrollblut wird wiederum auf seinen Titer hin geprüft. In diesem Fall konnte dann auf eine erneute Injektion verzichtet werden, da der Titer des Serums ausreichend hoch war.

Bei einer Verdünnung von 1:500 des Serums konnte noch eine positive Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen ermittelt werden.

Die Ergebnisse des Verfahrens des Western-Blots sind in Abb. 32 dargestellt und man erkennt deutlich die grau-blaue Bande im Bereich von 28 kDa, was dem Bereich der H-Untereinheit entspricht.

Das Serum wurde auch auf sein Verhalten gegenüber den Proteinen der Spinatthylakoide im Western-Blot getestet (Abb.33). Bemerkenswert ist eine Reaktion des Serums mit der β -Untereinheit der ATP-ase der Spinat-Thylakoide.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden in einer anderen Versuchsreihe Reaktionszentren, Spinatthylakoide und der c/f_1 -Komplex aus Spinat nebeneinander aufgetragen. Gegen diese Proteine wurden jeweils Antikörper gegen die H-Untereinheit und gegen die ATP-ase der Thylakoide im Western-Blot untersucht.

Wie Abb. 33 zeigt, reagiert das Serum der Antikörper gegen die H-Untereinheit an der gleichen Stelle wie der spezifische Antikörper gegen die β -Untereinheit sowohl im Spinat als auch im c/f_1 -Komplex. Es findet umgekehrt keine Reaktion des Antikörpers für die ATP-ase gegen die H-Untereinheit der Reaktionszentren statt.



Abb. 32: Photographie einer Nitrocellulose nach Reaktion der Antikörper gegen die H-Untereinheit mit Reaktionszentren
 1 + 2 = Kontrolle mit O-Serum (keine Reaktion)
 3 - 6 = Reaktion des Antikörpers mit der H-Untereinheit, Verdünnungen des Serums: 1:100, 1:200, 1:400, 1:500

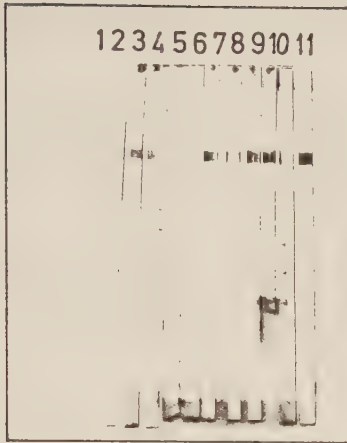


Abb.33: Photographie einer Nitrocellulose nach Reaktion der Antikörper gegen die H-Untereinheit und gegen die β -Untereinheit der Spinatthylakoide

1-3 = Reaktion der β -Antik. gegen Thylakoide

4+5 = Reaktion des β -Antik. gegen die H-Untereinheit (keine Reaktion)

6-8 = Reaktion des H-Antik. gegen Thylakoide (Reaktion im Bereich der β -Untereinheit)

9-11 = Reaktion des H-Antik. gegen c/f,-Komplex (Reaktion im Bereich der β -Untereinheit)

2.14 Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch Antikörper

Im Elektronentransportsystem der Reaktionszentren wurden die Antikörper gegen die H-Untereinheit in Bezug auf ihre Hemmeigenschaften getestet.

Die Reaktionszentren erhielten als Donor wieder red. Cytochrom c, als Akzeptor Ubichinon UQ-6 und die Messung erfolgte ebenfalls wie bereits beschrieben nach dem Prinzip der Querbelichtung am Spektralphotometer. (Kapitel 2.7)

In diesem Meßsystem wurde das 0-Serum, das Serum der 1. Zapfung und das Tot-Serum näher untersucht und die Zugabe der Antikörper von 1-10 μ l variiert.

Der Verbrauch an red. Cyt. c / h der Messung des 0-Serums, welches noch keine Antikörper enthielt, entsprach der des Blindwertes; es trat also keine Hemmung ein. Beim Tot-Serum und dem Serum der 1. Zapfung währenddessen, war schon bei Zugabe von 2-5 μ l eine wirksame Hemmung zu verzeichnen. Bei Zugabe von 10 μ l Antikörperserum trat keine Reaktion mehr auf, es fand demnach kein Elektronentransport mehr statt.

Zu bemerken ist, daß sich die Elektronentransportrate der Kontrolle bei Zugabe von 10 μ l 0-Serum ebenfalls um ca. 30% verminderte.

Tabelle 8 demonstriert anhand des Verbrauchs an red. Cytochrom c die Abnahme der Aktivität der Reaktionszentren nach Zugabe verschiedener Mengen an Antikörper.

Tab. 8: Darstellung der Abnahme der Aktivität der Reaktionszentren nach Zugabe verschiedener Mengen an Antikörper anhand des Verbrauchs an red. Cyt c/h

Zugabe des Antikörpers in μl	Verbrauch red. Cyt. c/h bei Zugabe des Antikörpers in μMol	in %	Verbrauch red. Cyt c/h bei Zugabe des O-Serums in μMol	in %
-	71	100	71	100
1	51	73	71	100
2	44	62	71	100
3	35	50	71	100
4	26	37	68	95
5	21	30	64	90
10	-	0	49	70

2.15 Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch verschiedene Hemmstoffe in isolierten Reaktionszentren

Verschiedene Gruppen von Herbiziden sind in der Lage, den photosynthetischen Elektronentransport des Photosystem II der grünen Pflanzen zu hemmen. Einige von ihnen vermögen ebenfalls den Elektronentransport in isolierten Reaktionszentren zu hemmen. Bisher waren diese Hemmstoffe im bakteriellen System aber immer weniger wirksam als im Photosystem II.

Einige der besten Photosystem II Hemmstoffe sind im bakteriellen System vollständig inaktiv. Ein Vergleich der Hemmaktivitäten in beiden Systemen in Kombination mit Molecular Modelling sollte gewisse Rückschlüsse auf die Architektur von Photosystem II erlauben.

Nach Bestimmung der Aktivität der Reaktionszentren werden in die Meßküvetten jeweils steigende Konzentrationen des zu bestimmenden Hemmstoffes gegeben und die Elektronentransportrate bestimmt.

Die Konzentration, die zu 50% Hemmung des Elektronentransports führt, wird aus einem Diagramm extrapoliert und der negative dekadische Logarithmus dieses Wertes errechnet. Dieser pI_{50} -Wert ist ein charakteristischer Parameter für die Affinität eines Hemmstoffes zu seiner Bindestelle und für die Zuordnung innerhalb seiner Hemmstoffgruppe in Bezug auf eine quantitative Struktur-Wirkungs-Analyse.

Nachfolgende Tabellen geben Aufschluß über die getesteten Hemmstoffklassen und deren ermittelte pI_{50} Werte.

1. Diphenylamine und Diphenylether

In einer Testreihe wurden zahlreiche Diphenylether und Diphenylamine getestet, deren Struktur in Abb. 34 dargestellt ist. Die Verbindungen und deren Substituenten sind im einzelnen nicht aufgeführt, da keine Verbindung von ihnen in der Lage war, den Elektronentransport des bakteriellen Reaktionszentrums zu hemmen.

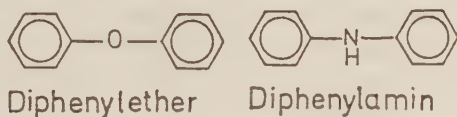
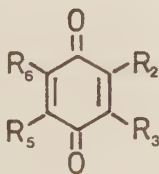


Abb.34 : Allgemeine Formeln der Diphenylamine (rechts) und Diphenylether (links)

2. Benzochinone

Tab. 9: Benzochinone



Nr.	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	PI ₅₀	PI ₅₀ im PS II H ₂ O-DCPIP
1	J	NH	(CH ₃) ₃ C	H	< 4	5.04
2	Br	Br	Br	H	4.9	4.49
3	Br	(CH ₃) ₂ CHO	Br	(CH ₃) ₂ CHO	< 4	5.21
4	Br	Br	Br	CH ₃ (CH ₂) ₅	< 4	5.23
5	Cl	CHO	Cl	CHO	< 4	4
6	Br	CH ₃	Br	CH ₃	< 4	-
7	F	F	F	F	5	-
8	Cl	Cl	Cl	Cl	5.25	4.8
9	Br	Br	Br	Br	5.6	5.89
10	J	J	J	J	6	7.02

Substituierte 1,4-Benzochinone sind als Hemmstoffe des Elektronentransports des PS II bereits bekannt und es zeigte sich anhand der quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse, daß ihre biologische Aktivität sowohl von dem Redoxpotential als auch von sterischen Parametern abhängig ist (Soll, und Oettmeier, 1984).

Analog zum PS II zeigen allerdings die 2,3,5,6-halogenierten 1,4-Benzochinone im bakteriellen Reaktionszentrum ebenfalls Hemmeigenschaften. Wie auch im PS II zeigt sich eine Steigerung der biologischen Aktivität der 2,3,5,6-halogenierten Benzochinone in der Reihenfolge $\text{Cl} < \text{Br} < \text{J}$, was bedeutet, daß das Tetra-Jod-halogenierte-1,4-Benzochinon den besten Inhibitor mit einem pI_{50} von 6.0 darstellt.

Wichtig ist, daß manche halogenierte 1,4-Benzochinone im Test-System auch in der Lage sind, den Elektronenakzeptor Ubichinon UQ-6 zu ersetzen. Terbutryn vermag diesen Elektronentransport zu hemmen.

In Tab. 10 sind diese 1,4-Benzochinone aufgeführt. Diese Akzeptoreigenschaft hängt mit dem Redoxpotential der Verbindungen zusammen. Das Redoxpotential in mVolt ist in einer Spalte der Tabelle angeführt. Die 1,4-Benzochinone zeigen bei einem Redoxpotential von -200 bis ca. -600 mVolt diese Akzeptoreigenschaften.

Tab. 10: Benzochinone mit Angabe ihrer Redoxpotentiale

Nr.	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	Redoxpotential in mVolt	Akzeptor- eigenschaften
1	Cl	Cl	(CH ₃) ₃ C	H	-195	schlecht
2	Br	Br	(CH ₃) ₃ C	H	-208	mäßig
3	J	J	(CH ₃) ₃ C	H	-238	gut
4	Br	H	(CH ₃) ₃ C	H	-309	gut
5	J	CH ₃	H	(CH ₃) ₂ CH	-420	sehr gut
6	Cl	(CH ₃) ₃ C	Cl	(CH ₃) ₃ C	-449	gut
7	(CH ₃) ₃ C	H	H	(CH ₃) ₃ C	-585	mäßig
8	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-632	schlecht

3. S-Triazine

Triazine sind, wie bereits beschrieben, sehr effektive Hemmstoffe des bakteriellen Reaktionszentrums (Atrazin, Terbutryn). Die nachfolgende Abbildung stellt den Vergleich der pI₅₀-Werte für Triazine im bakteriellen Reaktionszentrum und im Photosystem II dar (Abb. 35).

Alle Triazine sind im Photosystem II sehr gute Hemmstoffe, was auch in der Abbildung ersichtlich wird. Hier ergibt sich eine Steigerung der Aktivität von R₁ = OCH₃, über R₁ = Cl zu R₁ = SCH₃. Die Hemmwirkung steigt mit zunehmender Größe des Restes R₂ an, erreicht bei t-Butyl ein Maximum und fällt mit steigender Größe wieder ab.

Im bakteriellen System sind alle Verbindungen mit R₁=OCH₃ inaktiv; von der Serie mit R₁ = Cl waren nur die Verbindungen mit R₂ = t-Butyl oder iso-amyl relativ schlecht wirksam. Die wirksamsten Vertreter im bakteriellen System waren die Triazine mit R₁ = SCH₃. Hier zeigte sich eine ähnliche Abhängigkeit von der Größe von R₂ wie im Photosystem II.

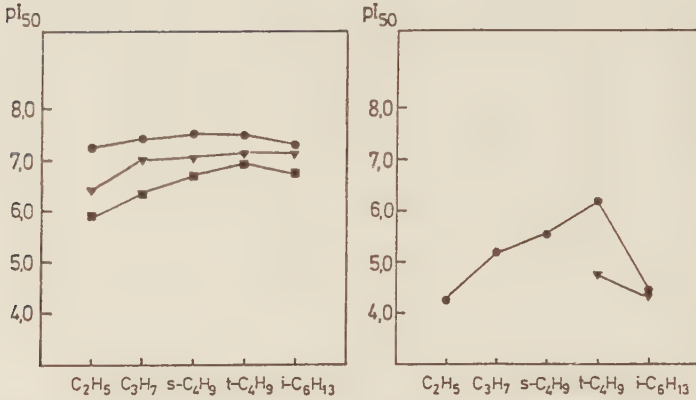
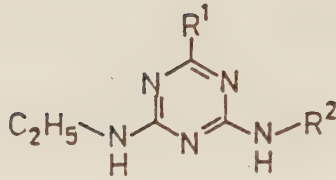
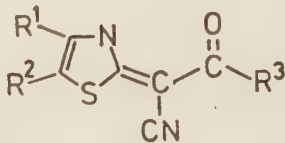


Abb.35: pI_{50} -Werte für die Hemmung des Elektronentransports im PS II (links) und im bakteriellen Reaktionszentrum (rechts) der Triazine. $R_1 = \bullet\text{---}\bullet$ SCH₃, $R_1 = \blacktriangle\text{---}\blacktriangle$ Cl, $R_1 = \blacksquare\text{---}\blacksquare$ OCH₃. Substituent R_2 zeigt die Abszisse.

4. Thiazoliden-Ketonitrile



Tab.11: Thiazoliden-Ketonitrile

R ₁	R ₂	R ₃	pI ₅₀	pI ₅₀ im PS II
Phenyl	H	Phenyl	5.23	5
Phenyl	H	CH ₂ -Phenyl	<4	5.22
Phenyl	H	CH ₂ -4-Cl-Phenyl	5.45	4.7
Phenyl	H	CH ₂ -2,4-diCl-Phenyl	6.33	4.52
t-Butyl	H	CH ₂ -Phenyl	<4	6.15
2-Naphtyl	H	CH ₂ -Phenyl	5.54	6.7
4-Cl-Phenyl	H	CH ₂ -Phenyl	5.7	6.1
2,4-diCl-Phenyl	H	CH ₂ -Phenyl	5.8	7.2

In dieser Hemmstoffklasse erwies sich der Inhibitor mit R₁ = Phenyl und R₃ = CH₂-2,4-diCl-Phenyl im Gegensatz zum PS II als einer der besten mit einem pI₅₀-Wert von 6.33. Er ist somit wesentlich besser als im Photosystem II. Das ist deshalb von besonderer Bedeutung, da Hemmstoffe, die im bakteriellen System besser sind als im PS II bisher nicht bekannt waren.

Auch der Inhibitor mit R₃ = CH₂-4-Cl-Phenyl zeigt im bakteriellen System bessere Hemmeigenschaften als im PS II. Dort beträgt sein pI₅₀-Wert nur 4.7, während er im bakteriellen System bei 5.45 liegt.

Allerdings ist es wahrscheinlich wichtig, daß der halogenhaltige Substituent in der Position R₃ sein muß, denn liegt er in R₁ oder R₂, läßt die Hemmwirkung nach und die pI₅₀-Werte liegen niedriger als die im Photosystem II.

Anhand der für das bakterielle Reaktionszentrum relativ guten pI₅₀-Werte für die halogenierten Thiazoliden-Ketonitrile läßt sich feststellen, daß mit steigender Anzahl an Halogen-Substituenten auch die biologische Aktivität der Hemmstoffe zunimmt.

2.16 Identifizierung von Hemmstoffbindeproteinen in Chromatophoren und Reaktionszentren

2.16.1 Photoaffinitätsmarkierungsexperimente

Seit geraumer Zeit ist die Photoaffinitätsmarkierungstechnik ein wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung von Proteinen, die Erkennungsstellen für ein bestimmtes Substrat, ein Hormon oder auch für einen Hemmstoff tragen (Bayley, 1983).

Es handelt sich meist um Azide, die von Hemmstoffen abgeleitet sind und im Licht zu einer kovalenten Reaktion mit Proteinen fähig sind.

Durch die Photoaffinitätsmarkierungstechnik wird die Aufklärung über die Struktur und die Lokalisierung der Rezeptoren ermöglicht. Für die Experimente standen folgende Hemmstoffe zur Verfügung:

Azido-Atrazin (Amersham, Braunschweig)

Azido-Thiazol (Schering, Berlin)

Azido-Dinoseb (Oettmeier et al. 1980)

Azido-Plastochinon (Oettmeier et al. 1984a)

Zur Durchführung der Experimente wird eine genau definierte Menge des Photoaffinitäts-"Labels" (10nmol/mg Bchl) zur Chromatophorensuspension bzw. zu den Reaktionszentren gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln zur Gewährleistung der Gleichgewichtseinstellung 15 min unter dem Schutzgas Argon mit UV-Licht bestrahlt (Dostatni, 1985).

Sowohl Reaktionszentren als auch Chromatophoren werden nach der Reaktion aufgrund ihrer geringen Größe nicht abzentrifugiert, sondern direkt im Solubilisierungsmedium für PAGE aufgenommen. Die Proben werden auf das SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und aufgetrennt.

Nach der Färbung der Proteine mit einem proteinspezifischen Indikator werden die einzelnen Slots senkrecht zur Laufrichtung in 1mm lange Stückchen geschnitten und ihre Radioaktivität im Scintillationszähler ermittelt, bzw. das getrocknete Gel durch Fluorographie analysiert.

Im Falle von Azido-Atrazin erwies sich die L-Untereinheit der Reaktionszentren als am stärksten markiert. Damit konnten die Ergebnisse von de Vitry und Diner, 1984 und Brown et al., 1984 bestätigt werden.

Die 24kD Untereinheit erfuhr ebenfalls eine geringe Markierung, wie es bei der Darstellung der Verteilung der Radioaktivität in Abb. 36 deutlich wird.

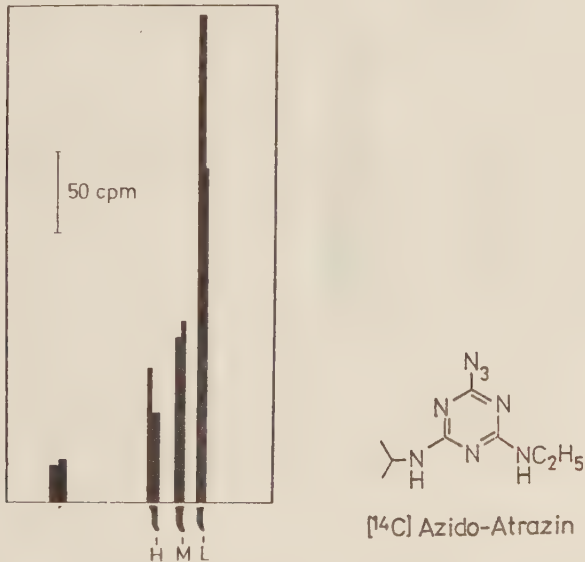


Abb. 36: Photographie eines SDS-Gels und Radioaktivitätsverteilung nach Markierung mit 10nmol/mg Bchl [14C] Azido-Atrazin. Darstellung der Formel.

Analog zu diesem Versuch führte die Photoaffinitätsmarkierung mit Azido-Thiazol und Azido-Dinoseb zum gleichen Ergebnis allerdings mit dem Unterschied, daß bei der Markierung mit Azido-Thiazol ebenfalls Radioaktivität in der H-Untereinheit, dem 28 kDa Protein zu verzeichnen war (Abb. 37 und 38). Abb. 38 zeigt die Fluorographie nach Markierung mit Azido-Thiazol. Deutlich ist die Schwärzung des Films im Bereich der L und der H-Untereinheit zu erkennen.

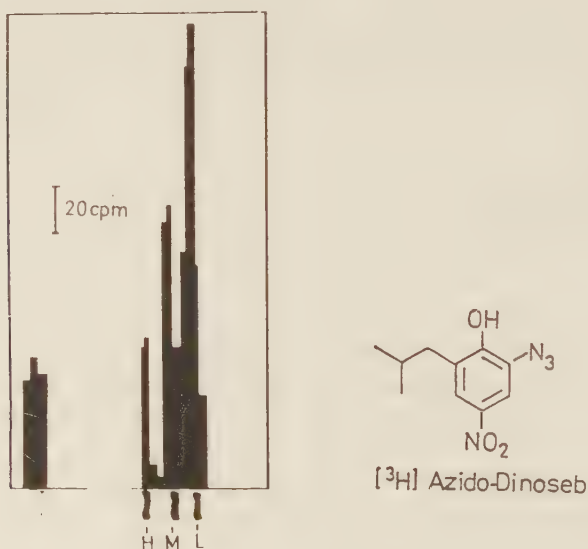
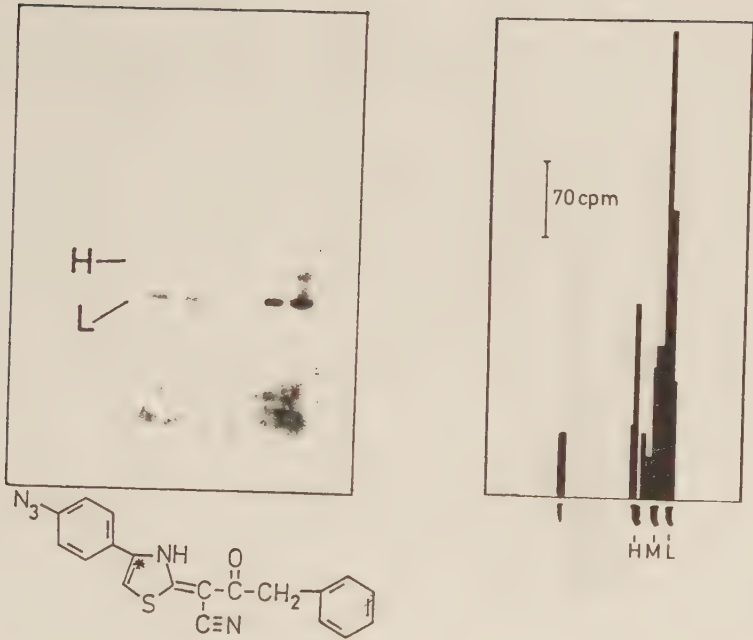


Abb. 37: Photographie eines SDS-Gels und Radioaktivitätsverteilung in Reaktionszentren nach Markierung mit [³H] Azido-Dinoseb. Darstellung der Formel.

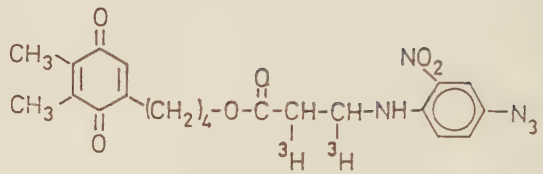
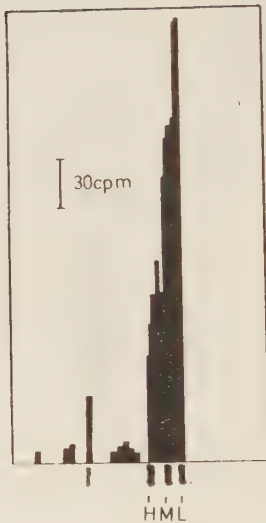


[¹⁴C] Azido-Thiazol

Abb. 38: Photographie eines Röntgenfilms mit zugehörigem SDS-Gel der Markierung mit Azido-Thiazol. Deutlich die Markierung in der L- und H-Untereinheit

Die Radioaktivitätsverteilung von Azido-Plastochinon ist in Abb. 39 dargestellt, allerdings wurde dieser Hemmstoff in geringer Konzentration eingesetzt, da er zum einen eine sehr hohe spezifische Aktivität von 289 mCi/mmol aufwies und zum anderen auf diese Art eine relativ hohe unspezifische Bindung niedrig gehalten werden sollte.

Azido-Plastochinon ist eine lipophile Verbindung, die bevorzugt an hydrophobe Proteine und an freies Lipid bindet. Deutlich wird in Abb. 39 die Markierung der Proteine L und M, wobei das 22 kDa-Protein die Hauptmenge an Radioaktivität aufweist.

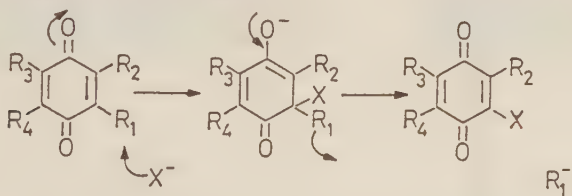


$[^3\text{H}]$ Plastochinonazid

Abb. 39: Photographie eines SDS-Gels und Radioaktivitätsverteilung in Reaktionszentren nach Markierung mit $[^3\text{H}]$ Azido-Plastochinon. Darstellung der Formel.

2.16.2 Kovalente Bindung von Hemmstoffen durch einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus

Für eine kovalente Bindung von bestimmten Hemmstoffen an Proteine bedarf es keiner photolabilen Verbindung, sofern sie selbst eine reaktive Gruppe besitzt. Bei dem Hemmstoff Tetra-Brom-Benzochinon (Bromanil, pl_{50} -Wert, siehe Tabelle 9) einem Hemmstoff aus der 1,4-Benzochinon-Reihe, ist eine kovalente Reaktion mit nukleophilen Gruppen von Proteinen möglich. Nukleophile Gruppen, wie sie zum Beispiel die OH-, SH- und NH_2 -Gruppen der Aminosäuren Ser, Thr, Cys, Lys, und Arg repräsentieren, reagieren kovalent nach folgendem Schema mit dem [^{14}C] markierten Bromanil:



$X = \text{NUKLEOPHIL}$

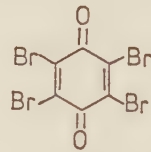
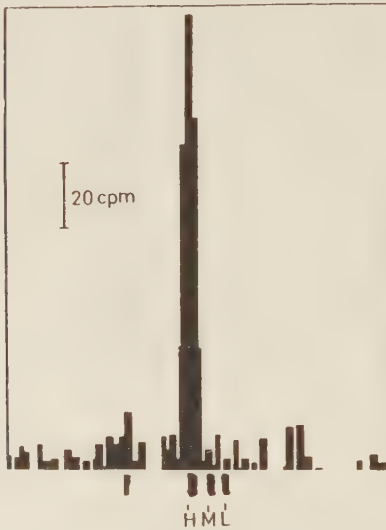
$R = \text{HALOGEN}$

Der Versuchsaufbau läßt sich folgendermaßen beschreiben:

Die Reaktionszentren mit einer Konzentration von 1mg Bchl/ml werden im Reagenzglas mit Bromanil inkubiert, anschließend sofort im Solubilisierungsmedium für PAGE aufgenommen und auf dem Gradientengel aufgetrennt.

Ein eindeutiges Ergebnis bei der Radioaktivitätsverteilung stellt Abb. 40 dar. Bromanil hat fast ausschließlich an das 28 kDa-Protein, an die H-Untereinheit der Reaktionszentren gebunden. Mit ca. 200 counts/min in der H-Untereinheit konnte dieses Ergebnis in wiederholten Experimenten abermals bestätigt werden.

Dieses Experiment wurde zur Unterstützung des Ergebnisses ebenfalls mit Chromatophoren von Rhodobacter sphaeroides und mit Chromatophoren aus Rhodospirillum rubrum durchgeführt. Auch hier konnte eine Markierung der H-Untereinheit der Reaktionszentren bestimmt werden (Abb. 41).



(Bromanil)

Tetra-Brom-p-Benzochinon

Abb.40: Photographie eines SDS-Gels und Radioaktivitätsverteilung in Reaktionszentren nach Markierung mit $[^{14}\text{C}]$ Bromanil.

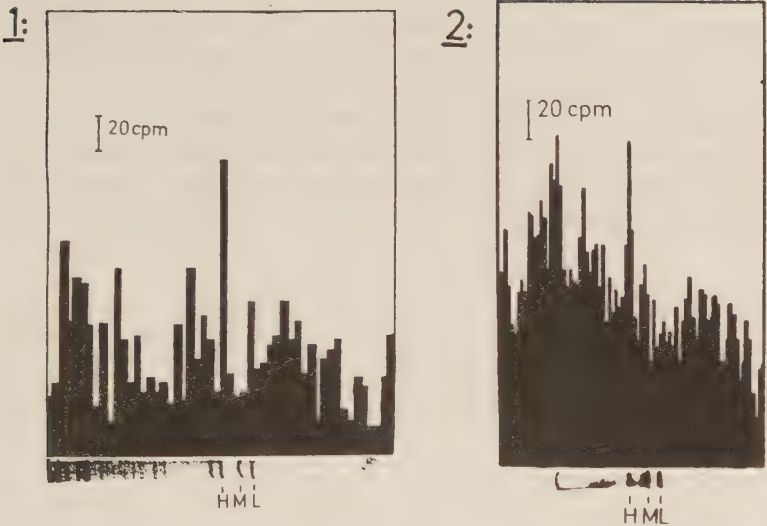


Abb. 41: Photographie eines SDS-Gels und Radioaktivitätsverteilung in Chromatophoren von 1 = *Rhodobacter sphaeroides* und von 2 = *Rhodospirillum rubrum* nach Markierung mit [^{14}C] Bromanil

An dieser Stelle soll die Verdrängung des [^{14}C] Bromanil mit Terbutryn nochmals dargestellt werden, um das Ergebnis des Verdrängungsversuchs aus Abs. 2.4 anhand der PAGE bestätigen zu können. Entsprechend dem Versuch aus Abs. 2.4 wurden an dieser Stelle adäquate Bedingungen eingehalten, nur wurden die Proteine anschließend im Gradienten-Gel aufgetrennt.

Nach 10minütiger Inkubationszeit des [^{14}C] Bromanil wurden 50nmol Terbutryn in den Versuchsansatz pipettiert. Die Radioaktivitätsverteilung der Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte die Ergebnisse des Bindungsversuchs aus Abs. 2.4 bestätigen.

Im Kontrollversuch erreichte die Radioaktivität in der H-Untereinheit der Reaktionszentren 300 counts/min. Anschließend wurde zunächst Bromanil und dann Terbutryn zugegeben, wobei in diesem Falle die Radioaktivität mit 270 counts/min mit der im Kontrollversuch fast identisch war. So wurde umgekehrt erst Terbutryn und dann Bromanil zugegeben, und es war ein Anstieg der Radioaktivität um 150 counts/min auf ca. 500 counts/min zu verzeichnen.

3. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus verschiedener Hemmstoffe im photosynthetischen Reaktionszentrum des Bakteriums Rhodobacter sphaeroides zu erhalten.

Die experimentellen Daten umfassen sowohl Bindungsversuche, Photoaffinitätsmarkierungen, Messung des photosynthetischen Elektronentransports, als auch Herstellung von Antikörpern und proteolytische Spaltung der Reaktionszentren und Chromatophoren.

Chromatophoren und Reaktionszentren wurden nach der Isolierung sauber erhalten und die drei charakteristischen Banden der Reaktionszentren, nämlich die L-, M- und H- Untereinheiten wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung identifiziert.

Tischer und Strotmann führten erste Bindungsversuche an isolierten Thylakoiden des Spinats durch.

Bindungsversuche von radioaktiv markierten Hemmstoffen an Chromatophoren waren bisher nicht bekannt und wurden in dieser Arbeit erstmals durchgeführt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Bindungsexperimente sollten allerdings kritisch betrachtet werden, da der Ablauf der einzelnen Experimente auf Grund verschieden angewandter Methoden unterschiedlich war. Folglich stimmten zwar die Ergebnisse in ihrer Tendenz überein, die berechneten Parameter für die einzelnen Methoden wiesen jedoch nicht immer die gleichen Werte auf.

Nach der ersten Methodik wurden die Chromatophoren nach beendeter Inkubationszeit über eine Membran abfiltriert, wobei sich die Chromatophoren nicht immer gleichmäßig auf der Membran verteilten und noch teilweise freier Hemmstoff des Mediums an der Membran anhaftete. Dadurch ergaben sich Schwankungen in der Bestimmung des gebundenen Hemmstoffes.

Nach der zweiten Methode wurden die Chromatophoren nach beendeter Inkubationszeit mit dem Hemmstoff bei hoher g-Zahl abzentrifugiert und das Pellet vom Überstand getrennt. Die Ergebnisse nach dieser Methode ließen sich besser reproduzieren, da die Proben hier stets gleich behandelt wurden.

Bereits 1984 haben Stein et al. gezeigt, daß Terbutryn den Elektronentransport in Rhodobacter sphaeroides R-26, der carotinoidfreien Mutante von Rhodobacter sphaeroides, hemmt. Stein et al. fanden einen I_{50} -Wert von $3 \mu\text{M}$, was einem pI_{50} -Wert von 5.52 entspricht. Sie benutzten allerdings bei ihrem Versuch intakte Bakterien, so daß zusätzlich Permeabilitätsprobleme eine Rolle spielen können. Mit isolierten Reaktionszentren wurde in der vorliegenden Arbeit ein pI_{50} -Wert von 6.25 gefunden.

Im Bindungsversuch mit radioaktiv markiertem Terbutryn, konnte eine spezifische Bindung des Hemmstoffes an die Chromatophoren gefunden werden. Die Bindungskonstante für Terbutryn wurde bestimmt. Sie beträgt $0.25 - 0.31 \mu\text{molar}$. Dies entspricht einem pK_b -Wert von 6.50-6.59. Damit ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen der Hemmstoff- und Bindungskonstanten.

Bei dem ebenfalls spezifisch bindenden Inhibitor DNSJ schwankte allerdings der berechnete pK_b -Wert je nach Auftragsweise nach Lineweaver-Burk oder Woolf-Augustinsson-Hofstee zwischen 5.6 - 7.1, entsprechend einer Bindungskonstanten von $0.08 - 1.7 \mu\text{M}$. Diese Schwankungen um etwas mehr als eine Zehnerpotenz lassen sich auf die schon geschilderte Ungenauigkeit der Meßmethodik zurückführen.

Ioxynil, Pikrinsäure, DCMU und Phenisopham wiesen keine spezifische Bindung an Chromatophoren auf, wie aus den Bindungskurven ersichtlich ist. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Messungen des photosynthetischen Elektronentransports, den weder Ioxynil, noch Pikrinsäure, DCMU oder Phenisopham zu hemmen vermochten.

Bei Bindungsexperimenten mit radioaktiv markiertem Bromanil war ebenfalls keine spezifische Bindung an Chromatophoren zu erkennen. Dies entspricht den mit Spinatthylakoiden erhaltenen Ergebnissen, wo ebenfalls keine spezifische Bindung beobachtet wurde. Es wurde gezeigt, daß Bromanil kovalent mit Thylakoiden reagieren kann.

Den Beweis dafür erbrachte ein Versuch mit Mercaptoethanol, welches eine Aufhebung der Hemmung des Bromanil an Chloroplasten bewirkte (Dostatni, 1985).

Dieser Effekt kommt dadurch zustande, daß die SH-Gruppe des Nukleophils Mercaptoethanol mit dem Chinon Bromanil unter Abspaltung eines Bromions reagiert. Diese neu entstandene chinoide Verbindung hat nur noch sehr schlechte Hemmstoffeigenschaften.

Von Bedeutung ist deshalb ein weiterer Aspekt der Bromanilbindung. Hier wurde festgestellt, daß sich bei einer Verweildauer von Bromanil im Reaktionsmedium von ca. 1/2 - 1 Stunde der Inhibitor in seiner Struktur verändern muß. Läßt man die Chromatophoren nach dieser Zeit mit dem Hemmstoff reagieren, wird lediglich die Hälfte der Radioaktivität an die Chromatophoren gebunden. Im Überstand nimmt sie dagegen entsprechend zu. Vermutlich hat das Bromanil an dieser Stelle mit dem im Reaktionsmedium enthaltenen Wasser als Nukleophil reagiert. Folglich besaßen die durch Hydrolyse entstandenen Derivate des Bromanil eine geringere Affinität zu den Chromatophoren.

Der Verdrängungsversuch zeigte, daß sich das kovalent gebundene Bromanil von Terbutryn nicht mehr von seiner Bindestelle verdrängen ließ.

Umgekehrt wurde mehr Bromanil gebunden, wenn Terbutryn zuerst und anschließend Bromanil zu den Chromatophoren zugegeben wurde.

Dafür läßt sich zunächst keine eindeutige Erklärung finden.

Es wäre zu spekulieren, daß Terbutryn den Reaktionszentrumskomplex in seiner Konformation derart verändert, daß andere Verbindungen besseren Zugang finden können.

Daß sich Bromanil von seiner Bindestelle von Terbutryn nicht mehr verdrängen ließ, wird zum einen mit seiner kovalenten Bindung zusammenhängen, zum anderen sind verschiedene Bindestellen am Rezeptorprotein denkbar. Schließlich können aber auch zwei vollkommen unterschiedliche Rezeptorproteine der Grund dafür sein. Aufschluß darüber können die Markierungsexperimente geben.

Bei den Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten konnte für Azido-Atrazin, Azido-Dinoseb und Azido-Thiazol jeweils eine Markierung am L-Protein der Reaktionszentren ermittelt werden. Die Markierung an der L- Untereinheit mit Azido-Atrazin wurde bereits von de Vitry und Diner, 1984 und Brown et al., 1984 festgestellt und konnte damit bestätigt werden.

In Chloroplasten aus höheren Pflanzen wurde bereits früher gezeigt, daß Azido-Atrazin an das 32 kDa, D_1 -Protein im Photosystem II bindet, das auch für die Q_B -Bindung verantwortlich ist (Pfister et al., 1981). Auch als Herbizid-Bindeprotein bezeichnet, weist dieses D_1 -Protein Sequenzhomologien zur L-Untereinheit des bakteriellen Reaktionszentrums auf (Youvan et al., 1984, Williams et al., 1984, Michel et al., 1986).

Es war daher nicht verwunderlich, daß Azido-Atrazin analog zum 32 kDa-Protein des PS II die L-Untereinheit der Reaktionszentren markiert.

Später wurde die Sequenz des zweiten Reaktionszentrum-proteins des PS II vom Spinat, (des D_2 - Proteins) bekannt, welches wiederum Homologien mit der M-Untereinheit des bakteriellen Reaktionszentrums aufweist.

In wieweit Übereinstimmungen in Bezug auf gemeinsame Bindestellen zwischen Terbutryn und Azido-Atrazin an den Rezeptorproteinen L bzw. D_1 bestehen kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht exakt dokumentiert werden. Was die L-Untereinheit angeht, so haben Michel et al. die Aminosäuren für die Terbutryn-Bindung identifiziert.

Es kommen im einzelnen folgende Aminosäuren in Frage: Serin L223 steht mit einer Seitenkette als Akzeptor mit dem Ethyl-Amino-Stickstoff des Terbutryn als Donor in Verbindung. Weiterhin handelt es sich um Isoleucin L224, welches mit seinem Amid-Stickstoff mit dem N_3 des Triazin-Ringes verbunden ist.

Verglichen mit der Sequenz des D_1 -Proteins entspricht Serin L 223 dem D_1 Serin 265. Serin ist somit konserviert. Zum anderen entspricht Isoleucin L224 im D_1 -Protein der Aminosäure Phenylalanin D_1 266 (F266).

Ebenso stellen die Aminosäuren Valin L220, Isoleucin L229, und Phenylalanin L216 (welches für die Q_B -Bindung verantwortlich ist) mit Terbutryn in der L-Untereinheit einen Kontakt her. Im D_1 -Protein entspräche das den Aminosäuren Isoleucin 260, Leucin 272 und Phenylalanin 256. Phenylalanin wäre somit als einzige von ihnen konserviert.

Für den Hemmstoff Azido-Atrazin sind die an der Bindung beteiligten Aminosäuren des D_1 -Proteins identifiziert worden und können denen der L-Untereinheit gegenübergestellt werden. Zum einen handelt es sich um Methionin 214, (Wolber et al., 1986), welches der Aminosäure Leucin L189 entspricht, zum anderen wird eine weitere Bindestelle zwischen den Aminosäuren D_1 215 und dem Arginin D_1 225 vermutet, die vergleichbar mit dem Bereich L 190 bis L 200 des bakteriellen Reaktionszentrums ist.

Für einen gezielten Vergleich beider Proteine mit ein und demselben Hemmstoff bedarf es noch der Sequenzierung der L-Untereinheit nach Markierung mit Azido-Atrazin.

Dies macht deutlich, daß nicht nur Sequenzhomologien für eine Vergleichsanalyse ausschlaggebend sind, denn die effektive Homologie zwischen beiden Proteinen beträgt lediglich 24.5%.

Bei Azido-Thiazol trat zusätzlich noch eine Markierung an der H-Untereinheit, dem 28 kDa-Protein, auf. Das würde bedeuten, daß dieses Protein doch eine Rolle im Elektronentransport der Reaktionszentren spielen muß. Bisher schrieb man der H-Untereinheit nur die Funktion zu, den L,M-Komplex zu stabilisieren. Eine direkte Beteiligung am Elektronentransport wurde bisher nicht festgestellt.

Daß die H-Untereinheit doch eine Funktion bei der Elektronentransportreaktion ausübt, haben Debus et al., 1985 beschrieben, indem sie zeigten, daß der Elektronentransport von Q_A -nach Q_B in Reaktionszentren, deren H-Untereinheit fehlt, um zwei Zehnerpotenzen reduziert ist.

Bei dem im Kapitel 2.16.1 vorgestellten Experiment mit Plastochinon-Azid reagierte dieses zwar ebenfalls mit dem L-Protein, gleichzeitig konnte auch eine schwache Markierung an der M-Untereinheit festgestellt werden.

Marinetti et al., 1979 konnten mit einem anderen Azido-Chinon, nämlich mit Azido-Anthrachinon eine Markierung an der M-Untereinheit beobachten.

Der Grund für die Synthese eines Azido-Anthrachinons war die Feststellung von Okamura et al. (1975), daß Anthrachinone das Ubichinon in den Reaktionszentren ersetzen können. Speziell für den Nachweis, daß sich die Bindestelle des primären Chinonakzeptors an der M-Untereinheit befindet, sollte dieses Chinon-Analogon das Ubichinon ersetzen.

Eine Markierung erfolgte aber erst nach Eliminierung des Q_A aus den Reaktionszentren, das heißt, sobald die Bindenische für das Chinon nicht besetzt war. Sobald die Bindestelle mit dem primären Akzeptor belegt war, wurde die M-Untereinheit nicht markiert.

Eine weitere Bestätigung für die Bindestelle des primären Akzeptors an der M-Untereinheit, wie ihn Feher et al. mit Azido-Anthrachinon erbrachten, wollte Worland et al. mit einer Markierung mit $[^3H]$ 2-Acetoxymethyl-1,4-Naphthochinon vornehmen. Dieses Naphthochinon reagierte allerdings überwiegend mit der L-Untereinheit der Reaktionszentren. Eine Interpretation für diese Markierung gaben Wolber et al. unter Berücksichtigung der Daten der Röntgen-Strukturanalyse, in der deutlich wird, daß die Kopfgruppe des Menachinons in Rhodopseudomonas viridis, zwar direkt Kontakt mit der M-Untereinheit besitzt, jedoch auch in bestimmten Bereichen der L- und H-Untereinheit dicht benachbart ist.

Wolber et al. vermuteten außerdem, daß Azido-Anthrachinon und das Naphthochinon unterschiedliche Bindungsstellen an der Q_A -Seite besitzen.

Eine Bestätigung für eine Funktion der H-Untereinheit im photosynthetischen Elektronentransport der Bakterien zeigt die Markierung dieses Proteins mit $[^{14}C]$ Bromanil.

Dies ist umso erstaunlicher, da bisher noch kein Inhibitor bekannt ist, der nur mit der H-Untereinheit in Wechselwirkung tritt.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Bromanil aufgrund seiner elektrophilen Eigenschaften lediglich mit den nukleophilen Gruppen der Aminosäuren eines Proteins reagieren kann, wie zum Beispiel den SH-, OH- und NH_2 -Gruppen von Cystein, Serin, Thyrosin und Lysin.

Anlaß für diese Annahme gibt die Sequenz der H-Untereinheit, in der im Verhältnis zu L und M relativ viel Lysin und Arginin enthalten ist.

Im Verlauf der Arbeit ist es aber nicht gelungen, die mit Bromanil markierte H-Untereinheit zu sequenzieren, was diese Annahmen hätte bestätigen können.

Wie bereits erwähnt, können Hemmstoffe sowohl im bakteriellen Zentrum als auch im Photosystem II die Q_B -Bindestelle besetzen und damit den Elektronentransport unterbrechen. Ein Vergleich der Hemmaktivitäten im bakteriellen Reaktionszentrum und im Photosystem II sollte wichtige Aufschlüsse über die Struktur und Architektur des Photosystem II liefern.

Neben 1,4-Benzochinonen wurden Diphenylether, Diphenylamine, verschiedene Triazine und Thiazoliden-Ketonitrile eingehend auf ihre Hemmstoffeigenschaften hin untersucht.

Diphenylamine und Diphenylether, die Photosystem II-Hemmstoffe darstellen, sind im bakteriellen Zentrum inaktiv. Untersucht wurden auch die Akzeptoreigenschaften einiger Benzochinone, die den photosynthetischen Elektronentransport ohne Zusatz des Elektronenakzeptors Ubichinon UQ-6 stimulierten.

Der Elektronentransport ließ sich durch Zugabe von Terbutryn hemmen, woraus geschlossen werden konnte, daß diese Benzochinone aufgrund ihres Redoxpotentials von -200mVolt bis -500mVolt in der Lage sind als Elektronenakzeptoren zu wirken.

Daneben hemmen andere Benzochinone den Elektronentransport. Dies trifft besonders für die 2,3,5,6-tetra-halogenierten 1,4-Benzochinone zu. Ihre pI_{50} -Werte werden mit dem Anstieg des Molekulargewichts des Halogen-Substituenten größer.

Analog zur Hemmung des Elektronentransports an der Akzeptorseite des Photosystem II zeigte das Tetra-Jod-halogenierte 1,4-Benzochinon die besten Hemmeigenschaften. Sein pI_{50} -Wert ist in der bakteriellen Photosynthese um einen Faktor zehn schlechter als im Photosystem II.

Auffällig ist in der Reihe der Triazin-Verbindungen, daß lediglich die Gruppe der SCH_3 substituierten Verbindungen Hemmeigenschaften zeigten. Sie sind im bakteriellen Zentrum um ca. eine Zehner-Potenz schlechter als im PS II.

Für Chlor als Substituent am R_1 (siehe Abb.: 35)hemmten nur die Verbindungen, die für R_2 = tert.-Butyl (Terbutryn) und iso-Amyl besaßen.

Sobald jedoch eine OCH_3 -Gruppe als R_1 vorhanden ist, sind die Verbindungen im bakteriellen System völlig inaktiv. Abb.42 demonstriert einen Vergleich zwischen den OCH_3 und den SCH_3 -substituierten Triazinen und es wird deutlich, daß für OCH_3 als Substituent am R_1 der Abstand zum C-Atom des Benzol-Ringes wesentlich geringer ist, als bei SCH_3 . Somit gelangt dieser Rest nicht in die Bindenische und übt keine Hemmwirkung aus.

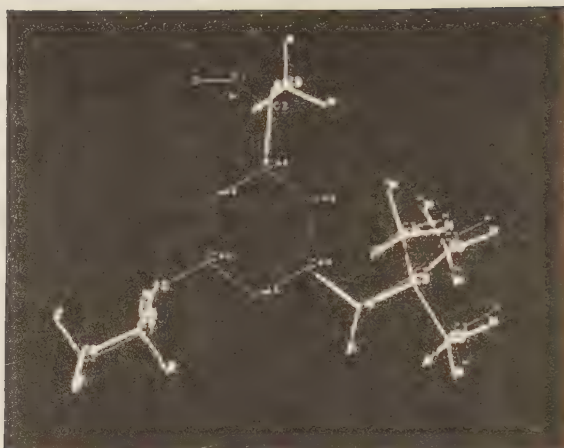


Abb. 42: Vergleich der Strukturen der s-Triazine mit dem Substituent $R_1 = \text{OCH}_3$ und dem Substituent $R_1 = \text{SCH}_3$

Auffällig ist, daß die Triazine bei $R_2 = t\text{-Butyl}$ ein Maximum ihrer Aktivität erreichen. Bei zunehmender Größe von R_2 nimmt die Aktivität wieder ab. Die tert-Butyl-Gruppe paßt offensichtlich in die Bindenische des bakteriellen Zentrums optimal hinein.

Kleinere Alkylsubstituenten am R_2 füllen die Bindenische nicht genügend aus, wie in Abb. 43 ein Vergleich der Strukturen von Terbutryn und einem Ethyl-substituierten Triazin zeigt.

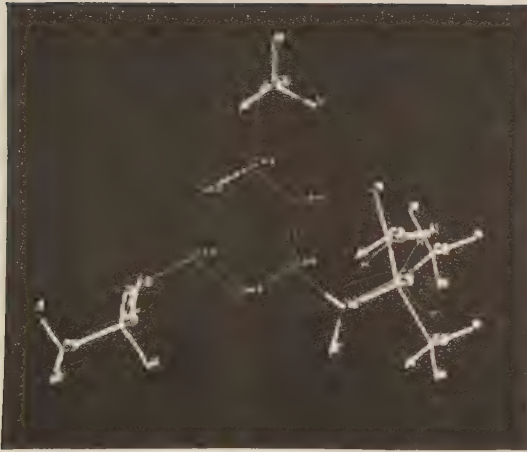


Abb. 43: Vergleich der Strukturen des Terbutryn und einem Ethyl-substituierten Triazin

Im Photosystem II noch aktive Hemmstoffe, wie zum Beispiel Diuron, oder Phenisopham, sind im bakteriellen Photosystem völlig inaktiv.

Um für die Inaktivität dieser Hemmstoffe eine Erklärung zu finden, wurden die Hemmstoffe Terbutryn und Diuron verglichen.

Abb. 44 verdeutlicht die strukturelle Anpassung beider Inhibitoren und demonstriert somit das Fehlen der wichtigen $\text{-NH-C(CH}_3)_3$ -Gruppe von Terbutryn beim Diuron.

Diese Gruppe ist ausschlaggebend für die Bindung des Terbutryn am Reaktionszentrum (Deisenhofer et al., 1985).

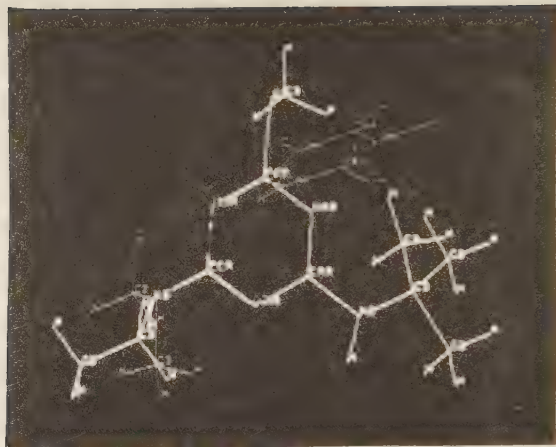


Abb.44 : Vergleich der Strukturen der Hemmstoffe Terbutryn und Diuron

Als weitere Hemmstoffklasse wurden im Elektronentransportsystem der Reaktionszentren Thiazoliden-Ketonitrile untersucht. Diese wurden kürzlich als sehr gute Photosystem II-Hemmstoffe beschrieben (Bühmann, et al., 1987). Im Vergleich zu Terbutryn besitzen sie ebenfalls eine Schwefelgruppierung im Thiazol-5-Ring und zusätzlich eine $=CN-C=O$ -Gruppierung.

Hier wurden zum ersten Mal im bakteriellen System pI_{50} -Werte ermittelt, die besser waren als im Photosystem II.

Entscheidend für die Hemmwirkung im bakteriellen Reaktionszentrum ist wahrscheinlich der Benzyl-Rest an der $C=O$ Bindung. Mit zunehmender Zahl von Cl-Substituenten nimmt die biologische Aktivität zu.

Sobald sich der Chlor-Substituent jedoch in der R_1 -Position (s. Tab. 11) befindet, läßt die biologische Aktivität nach.

Es ist anzunehmen, daß diese Gruppierung am R_3 in Verbindung mit der Carbonyl- und der Nitril-Gruppe genau in der Bindenische des Akzeptors Platz findet.

Da die pI_{50} -Werte im Photosystem II und im bakteriellen System für diese Verbindungen so verschieden sind, kann man vermuten, daß sich die Struktur beider Bindenischen in bestimmten Bereichen erheblich unterscheiden muß.

Zu einer neuen Interpretation zur Rolle der H-Untereinheit führen die Versuche mit dem Antikörper gegen diese Untereinheit. Bereits bei Zugabe von 5 μ l unverdünntem Serum war der Elektronentransport gehemmt und bei Zugabe von 10 μ l zeigten die Reaktionszentren keinerlei photosynthetische Aktivität mehr.

Dies bedeutet, daß das Vorhandensein der H-Untereinheit im Komplex für die vollständige Wirksamkeit des Reaktionszentrums wichtiger ist als bisher angenommen. Daneben wurden auch der L,M-Komplex auf seine Hemmbarkeit mit Terbutryn hin untersucht. Es konnte eindeutig festgestellt werden, daß sich Reaktionszentren, aus denen die H-Untereinheit abgetrennt wurde, durch Terbutryn wesentlich schlechter hemmen lassen als vollständige Reaktionszentren.

Damit wurde der Versuch von Debus et al., 1985 insofern bestätigt, daß die Inhibierungskonstante der Reaktionszentren für Terbutryn von ca. 2 μ Molar, auf ca. 300 μ Molar für den L,M-Komplex ansteigt.

Ferner stellten Debus et al. fest, daß die Semichinone Q_A - und Q_B - im L,M-Komplex gegenüber Oxidation weniger stabil sind als in intakten Reaktionszentren. Daraus ergeben sich Schlußfolgerungen für die Funktion der H-Untereinheit in den Reaktionszentren.

Die H-Untereinheit stabilisiert den L,M-Komplex und soll außerdem einen engen Kontakt beider Proteine gewährleisten, damit der Elektronentransport von Q_A nach Q_B reibungslos verläuft.

Die H-Untereinheit läßt sich leicht proteolytisch spalten. Durch die Lage der H-Untereinheit auf der cytoplasmatischen Seite der Membran findet das proteolytische Enzym genügend Angriffsstellen, an denen es, je nach seiner Spezifität, das Protein spalten kann.

Asparaginsäure und Glutaminsäure stellen beide die spezifischen Aminosäuren für die Spaltung des Proteins durch V_8 -Protease dar. Beide sind in der Sequenz der H-Untereinheit häufig vertreten. Das hat zur Folge, daß das Enzym genügend freiliegende Angriffsstellen für eine Spaltung findet und somit das Protein relativ schnell in zahlreiche Bruchstücke aufspalten kann.

Dies ist deutlich anders bei der L- und M-Untereinheit.

Durch die jeweils 5 transmembranen Helices sind diese Proteine gegenüber einer proteolytischen Spaltung wesentlich besser geschützt, zudem beinhaltet die Sequenz der Helices in der Membran weder Asparaginsäure noch Glutaminsäure. Beide sind lediglich auf der Außenseite der Membran sowohl im cytoplasmatischen als auch im periplasmatischen Bereich vorhanden.

Erstaunlich ist die Tatsache, daß die L-Untereinheit schon bei erheblich geringeren Konzentrationen eine Proteolyse erfährt und schon lange vollständig abgebaut ist, bevor die M-Untereinheit durch das Enzym angegriffen wird.

Der Vergleich beider Sequenzen erlaubt hierzu wenig Rückschlüsse, da sowohl Asparaginsäure als auch Glutaminsäure in etwa gleichen Mengen in beiden Proteinen vorhanden sind.

Möglich wäre, daß die L-Untereinheit gewisse Schutzfunktionen auf die M-Untereinheit ausübt und diese somit vor einer Proteolyse bewahrt.

Durch einen direkten Vergleich der Hydropathie der L- und M-Untereinheit stellten Williams et al. 1984 fest, daß M im Vergleich zu L reich an hydrophoben Aminosäuren ist. Dadurch könnten an die M-Untereinheit mehr LDAO-Detergenz-Moleküle gebunden sein, was einen Angriff der V_8 -Protease verhindern könnte.

Die Ergebnisse lassen deutlich werden, daß noch verschiedene Fragen in Bezug auf das bakterielle Reaktionszentrum offen sind und noch einige Problemstellungen näher untersucht und diskutiert werden müssen.

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse erlauben zahlreiche Vergleiche mit dem Reaktionszentrum der höheren Pflanzen. Durch gezielte Synthese weiterer Hemmstoffe von hemmstoffanalogen Photoaffinitätsreagenzien, die kovalent an verschiedene Proteine beider Reaktionszentren binden, sowie die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren, könnten in Zukunft weitere wichtige Informationen über die Art der Bindungen erhalten werden.

4. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse über Hemmstoffe des Elektronentransports im photosynthetischen Bakterium Rhodobacter sphaeroides sollen Rückschlüsse sowohl über Ähnlichkeiten als auch Unterschiede zum analog aufgebauten Photosystem II der höheren Pflanzen aufzeigen.

Bindungsversuche an isolierten Chromatophoren werden in dieser Arbeit erstmals durchgeführt. Sie sollen Aufschluß über die Affinität eines Inhibitors zu seiner Rezeptorstelle geben. Spezifische Bindungen an Chromatophoren werden für Terbutryn, dem bisher besten bekannten Hemmstoff im bakteriellen System, und für einen Vertreter der phenolischen Hemmstoffe dem DNSJ ermittelt.

Keine spezifische Bindung ergibt sich dagegen für andere hochwirksame Photosystem II Hemmstoffe wie Diuron, Phenisopham oder Ioxynil.

Führt man Verdrängungsversuche an Chromatophoren durch, an denen die Hemmstoffbindestelle mit kovalent bindendem [^{14}C] Bromanil belegt ist, so läßt sich dieses durch Terbutryn nicht mehr von seinem Rezeptorprotein verdrängen. Umgekehrt führt eine Vorinkubation mit Terbutryn zu einer Erhöhung der Bromanilbindung. Es lassen sich diese Ergebnisse nur mit unterschiedlichen, wahrscheinlich benachbarten Bindestellen beider Hemmstoffe erklären.

Zur Bestimmung der Aktivität der verschiedenen Hemmstoffe im bakteriellen Reaktionszentrum wird ein System zur Messung des "steady-state" Elektronentransports entwickelt. Hier wird reduziertes Cytochrom c unter Zusatz eines Elektronenakzeptors Ubichinon im Licht oxidiert. Untersucht werden Hemmstoffe der s-Triazin-Reihe, der Triazinone, der Benzochinone und der Thiazoliden-Ketonitrile.

Es stellt sich heraus, daß die Gruppe der Thiazoliden-Ketonitrile über bessere Hemmeigenschaften im bakteriellen System verfügt, als dies im Photosystem II der Fall ist. Je nach Stellung und Anzahl der Chlor-Substituenten erreichen ihre PI_{50} Werte von über 7.

Für die Triazin-Hemmstoffe erweisen sich die SCH_3 -substituierten mit einem Tert-Butyl oder iso-Amyl-Rest an der NH-Gruppierung als gute Inhibitoren.

Ebenso wie im Photosystem II zeigen die halogenierten Benzochinone, insbesondere das Tetra-jod-derivat, im bakteriellen Elektronentransport hemmende Eigenschaften, die allerdings um eine Zehnerpotenz geringer ausfallen als im Photosystem II.

Nach Isolierung der H-Untereinheit, werden gegen dieses 28 kDa-Protein Antikörper hergestellt. Im Elektronentransportsystem der Reaktionszentren erweisen sich diese Antikörper als wirksame Hemmstoffe.

Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit Azido-Atrazin haben bereits früher zur Identifizierung der Hemmstoffbindestelle an der L-Untereinheit der Reaktionszentren geführt. Wie Azido-Atrazin, so binden auch Azido-Dinoseb und Azido-Plastoquinon an die L-Untereinheit. Azido-Thiazol zeigt zusätzlich noch eine Markierung an der H-Untereinheit.

Im isolierten Reaktionszentrum und in Chromatophoren bindet Bromanil ausschließlich an die H-Untereinheit. Er ist bisher der einzige Inhibitor, der kovalent mit dieser Untereinheit reagiert.

Diese Markierung der H-Untereinheit sowie die Hemmwirkung des Antikörpers lassen vermuten, daß der H-Untereinheit im photosynthetischen Elektronentransport der Reaktionszentren eine größere Rolle zukommt als bisher vermutet wird.

5.) Material und Methoden1. Anzucht der Bakterien

Medium für Rhodospirillaceen, modifiziert nach GLOE
(Malat statt Succinat)

Medium

Bidest. Wasser	1 l
SL 6 (s.u.)	1 ml
KH_2PO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
NaCl	0.4 g
NH_4Cl	0.4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Äpfelsäure	1.5 g
Difco Hefeextrakt	2.0 g
Ethanol (unvergällt)	1 ml
Eisencitrat (s.u.)	6 ml
NaOH, titrieren auf pH	6.9

SL 6

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03 g
H_3BO_3	0.3 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03 g
Bidest. Wasser	1 l
HCl, einstellen auf pH	3-4

Fe-Citrat

Bidest. Wasser	100 ml
Fe(II)SO ₄	60.8 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	52.8 mg
Citronensäure	168 mg
NaOH titrieren auf pH	6.5

Die Bakterien werden in 1l oder 10l Glasbehältern mit Gummistopfen gezogen. Die Behälter werden mit dem Medium für 1h autoklaviert. Das Inoculum für diese Anzucht beträgt ca. 15% und für die Erhaltungskultur etwa 10%. Das Wachstum der Bakterien erfolgt anaerob. Nach der Überimpfung werden die Gefäße 6-8h an einen dunklen Platz gestellt, um den Bakterien das Veratmen des Restsauerstoffes zu ermöglichen. Die Anzucht erfolgt auf einer Lichtbank, die mit 2 x 60 Watt - Glühlampen ausgestattet ist. Dabei sollte die Temperatur von 30° C nicht überschritten werden.

Bei kontinuierlicher Anzucht sollte alle 7 Tage im Verhältnis 1:7 überimpft werden. Etwas häufiger wäre optimal.

2. Isolierung der Chromatophoren (Laborvorschrift, Scheer, H. München)

2.1 Die Bakterien werden bei 8000rpm (GS 3-Rotor, Sorvall) abzentrifugiert. Die Zellen werden anschließend mit der doppelten Menge Natrium-Phosphat-Puffer (NaPP, 100mM) aufgenommen.

Für die weiteren Schritte können ebenso gut tiefgefrorene Zellen verwendet werden.

- 2.2 Zu der Zellsuspension gibt man eine Spatelspitze Desoxyribonuklease und läßt sie unter Rühren 20min inkubieren.
- 2.3 Die Bakterien werden in der French Pressure Cell (Ribipress) bei 12000 psi bei einer Temperatur von ca. 15°C 2 x aufgeschlossen.
- 2.4 Die vereinigten Preßsäfte werden bei 10500 rpm 20min zentrifugiert, (SS 34, Sorvall). Dabei werden die aufgeschlossenen Zellen von groben Zellbestandteilen und intakten Zellen befreit.
- 2.5 Das Pellet wird noch einmal mit NaPP extrahiert und anschließend werden die Überstände 100min bei 48000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (50 Ti, Beckmann)
- 2.6 Der Überstand wird verworfen und das Pellet, welches die Chromatophoren enthält wird in wenig NaPP aufgenommen und gepottert.

3. Isolierung der Reaktionszentren (Laborvorschrift, Scheer)

- 3.1 Von der Chromatophorensuspension aus wird die Extinktion bestimmt und mit NaPP bei 870nm auf $OD = 50 \text{ cm}^{-1}$ eingestellt (Spektralphotometer, Kontron, Uvikon 820).

Ab hier werden alle Manipulationen im grünen Sicherheitslicht durchgeführt.

- 3.2 Um die Reaktionszentren (RC's) zu erhalten, werden die Chromatophoren 2-3mal mit LDAO (Lauryl-dimethylamin-oxid) dissoziiert. Um die genaue LDAO-Konzentration zu ermitteln, sollte man diese in Vorserien optimieren.

- 3.3 Die Chromatophorensuspension wird im Dunkeln mit LDAO bis zur Endkonzentration von 0.3% versetzt und 20min bei 26°C gerührt.
- 3.4 Anschließend wird 20min bei 12000 rpm zentrifugiert (SS 34, Sorvall). Das Pellet ist kalt zu stellen und der Überstand wird 100min bei 48000rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Ti 50, Beckmann).
- 3.5 Das Spektrum des UZ-Überstandes wird von 500-1000nm gemessen. Im Regelfall handelt es sich um den B800-850-Komplex.
In diesem Fall wird die Dissoziation (mit beiden Pellets) wiederholt. Bei jeder erneuten Dissoziation ist das Pellet mit NaPP auf eine optische Dichte von 50 cm^{-1} bei 870nm einzustellen.
Die Dissoziation muß gegebenenfalls ein drittes Mal wiederholt werden.
- 3.6 Nach der 2. oder 3. Dissoziation sollten gute RC's im UZ-Überstand sein. Eine Verunreinigung mit freien Pigmenten (770nm Band erhöht) ist unbedeutend, da diese in den folgenden Reinigungsschritten abgetrennt werden.
Bei einer Verunreinigung mit B800-850 ist eine neue Präparation ratsam, da sie schlecht abgetrennt werden kann.
- 3.7 Die RC's werden anschließend über Nacht in TL-Puffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, mit 0.08% LDAO Zusatz) dialysiert.
- 3.8 An einer DEAE-52 Säule (15cm x 2.5cm), die vorher mit TL-Puffer äquilibriert wurde, wird diese Lösung absorbiert.
- 3.9 Die Säule wird wie folgt gewaschen:

200ml TL-Puffer, 70mM NaCl
100ml TL-Puffer, 100mM NaCl
100ml TL-Puffer, 130mM NaCl
100ml TL-Puffer, 170mM NaCl

Es empfiehlt sich, die NaCl-Konzentration nur langsam zu erhöhen, da ein besserer Reinigungseffekt zu beobachten ist.

3.10 Die RC's werden dann mit 50ml TL-Puffer, 250-300mM NaCl von der Säule eluiert. Um sicher zu gehen, daß die RC's desorbieren, kann man die LDAO-Konzentration im TL-Puffer auf 0.5-0.7% erhöhen.

3.11 Die Spektren der aufgefangenen Fraktionen werden verglichen und gleich gute Fraktionen vereinigt.

Die gereinigten RC's können nun nach Dialyse über eine kleine DEAE-52 Säule (2.5cm x 1cm) oder durch Membranenfiltration (30kDa-Membran) konzentriert werden.

Anschließend tieffrieren.

4. Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehalts (Clayton, 1966)

5ml Aceton/Methanol (7:2) + 50µl Chromatophorensuspension
schütteln, filtrieren und Extinktion bei 775nm bestimmen.

Berechnung:

$$\frac{E_{(775\text{nm})} \times \text{Verdünnung}}{\epsilon} = A$$

$$A \times \text{MG} = \text{g BChl/l} \\ \text{bzw. mg /ml}$$

A : Wert (mol/l)

E : Extinktion bei 775nm

Verdünnung: x 100

MG : Molekulargewicht BChl = 877.5

ϵ : Extinktionskoeffizient des BChl
= 22.1×10^3

5A. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (nach Chua, 1980)

a) Lösungen:

I	Acrylamidlösung	: 300g Acrylamid 8g Bisacrylamid ad 1l H ₂ O + 2-3g Aktivkohle, 30min rühren 2x filtrieren
II	5x Lower-buffer	: 257g Tris in H ₂ O lösen, mit HCl auf pH 9.0 einstellen ad 1l H ₂ O
III	20x Upper buffer	: 99.2g Tris 28g Borsäure 20.0g SDS (LIDS) ad 1l H ₂ O
IV	Stacking-Gel-Buffer	: 26.2g Tris in H ₂ O lösen, mit konz. H ₂ SO ₄ auf pH 6.1 einstellen und mit H ₂ O auf 1000ml auffüllen
V	Saccharoselösung	: 60g Saccharose mit H ₂ O auf 100ml auffüllen
VI	APS-Lösung	: Polimerisationsstarter 10g APS ad 100ml mit H ₂ O
VII	SDS-(LIDS)-Lösung	: 10g SDS (LIDS) ad 100ml mit H ₂ O
VIII	Plug-Lösung	: 100ml Acrylamid-Lösung 300ml H ₂ O 0.5ml TEMED

b) Gießen von 2mm Gelen (10 - 15% Acrylamid):

1. Zwei ca. 25 x 30cm große Glasplatten werden mit 2mm Spacern dazwischen zusammengeklemt (Spacer: links, rechts und unten), die Zwischenräume sind mit Plug-Lösung und APS (wenige Tropfen) abzudichten.
2. Folgende Lösungen sind aus den Stammlösungen anzusetzen:

Stammlösung	10%	15%
I	30 ml	45 ml
II	18 ml	18 ml
V	7.6ml	25.8ml
VII	0.9ml	0.9ml
TEMED	40 µl	20 µl
mit H ₂ O ad je 90 ml		

3. Den hinteren Behälter eines Gradientenmischers mit 63ml 10%-Lösung, den vorderen mit 57ml der 15%-Lösung füllen.
4. In jeden Behälter 100µl APS als Starter zupipettieren und gut rühren.
5. In der vorderen Kammer für dauernde Durchmischung sorgen. Kammerverbindung öffnen und die sich mischenden Lösungen über einen Schlauch zwischen die Glasplatten leiten (Gesamter Gießvorgang ca. 15min).
6. Überschichten mit Isobutanol.

7. Nach der Polymerisation das Gel gründlich waschen, bis das Isobutanol entfernt ist. Anschließend Trenngel aufgießen und sofort Kamm einfügen.

Ansatz des Stacking-Gels:

Stammlösungen	
I	8 ml
IV	10 ml
VII	0.4ml
IV	0.4ml
TEMED	40 µl
ad 40ml Wasser	

8. Nach Beendigung der Polymerisation ist der untere Spacer zu entfernen und der entstandene Zwischenraum mit Plug und APS zu füllen.
Die Gele sind in feuchtem Papier und Folie mindestens 24 Stunden zu lagern.

c) Durchführung der Gelelektrophorese

1. Dichtung der Gelkammer dünn mit mittelviskosem Silikon beschichten.
2. Glasplatten des Gels trocknen und in die Gelkammer einspannen.
3. Falls es sich um LiDS-Gele handelt, alle weiteren Schritte im Kühlraum durchführen.
4. 1l Upper-Buffer 1 : 20 in die obere Kammer füllen, Kamm entfernen und ca. 30min Gel und Kammer auf Dichtigkeit prüfen.

5. 500ml Lower-Buffer 1 : 5 in die untere Kammer füllen.
6. Taschen von Gelresten befreien und Proben auftragen.
Bei 2mm Gelen max. 150µl Volumen, nicht mehr als 70 - 100µg Chlorophyll auftragen.
7. Die Proben werden in Lösung A und B aufgenommen. A und B werden vorher im Verhältnis 3 : 2 gemischt.
Zu den aufzutragenden Proben wird soviel Mercaptoethanol gegeben, bis die Endkonzentration in der Probe 5% beträgt.

Lösung A: 1.0ml 1M Na₂CO₃

9.0ml H₂O

Lösung B: 2.0ml 10% SDS

2.0ml 60% Saccharose

8. Laufzeit der Gele: 20 Std. bei konst. 220 V (4°C)
15 Std. bei konst. 160 V (20°C)

9. Es ist ratsam, eine Proteinstandardlösung auf dem Gel mitlaufen zu lassen, um anschließend einen Vergleich mit den Rf-Werten anstellen zu können.

d. Fixieren und Färben der Gele:

Fixier- und Entfärbelösung:

2 l MeOH

2 l H₂O

0.4l Essigsäure

Färbelösung :

500 ml MeOH

70 ml Essigsäure

2.5g Coomassie Brilliant Blue darin lösen,
ad 1000ml mit H₂O auffüllen.

1. Glasplatten entfernen und Gel ca. 30min fixieren.
2. Fixierlösung abgießen und nach dem Färben (ca. 1 Std.) so lange Gel mit der Entfärbelösung entfärben bis der Hintergrund vollständig klar ist.

5B. Gelsystem nach Jagow (Schägger, et al., 1985)

a) Lösungen:

I: Acrylamidlösung

45% Acrylamid (w/v)
1.5% Bisacrylamid (w/v)

II: Anodenpuffer

0.2 M Tris
mit HCl auf pH von 8.9 einstellen

III: Kathodenpuffer

0.1 M Tris
0.1 M Tricin
0.1 % SDS

IV: Gel-Puffer

3.0 M Tris
1.0 M HCl
0.3 % SDS

V: Overlay-Lösung

1.0 M Tris

0.33M HCl

0.1 % SDS

VI: Solubilisierungsmedium

5.0 % SDS

15.0 % Glycerin

50 mM Tris

2.0 % Mercaptoethanol

0.003% Bromphenol-Blau

mit HCl auf pH von 6.8 einstellen

b) Gießen von 2mm-Gelen

1. Lösungen für das Trenngel und das Sammel-Gel ansetzen

	16 % Trenngel	4 % Sammelgel
Acrylamid	50 ml	2.5 ml
Gel-Puffer	50 ml	7.5 ml
Glycerin	30 g	-
Wasser	ad 150 ml	ad 30 ml
TEMED	50 µl	25.0 µl
Ammoniumperoxo-disulfat	300 µl	250 µl

2. Gelgemisch eingießen und mit overlay-Lösung überschichten.

3. Nach der Polymerisation das Sammel-Gel aufgeben.

4. Laufzeit: ca. 40h bei 120V

5. Weiter verfahren wie unter 5A d.)

6. Aufarbeitung der Bakterien Rhodobacter sphaeroides für die Elektronenmikroskopie (Nieß, 1985)

Die Bakterien werden durch Zentrifugation vom Nährmedium getrennt und 20 min mit dem Enzym Glucuronidase inkubiert, um die Zuckereinlagerungen in der Membran proteolytisch abzubauen.

- a) Waschmedium: 0.05 M HEPES
 1.0 M Sorbit
 0.03 M Natriumchlorid
 0.02 M Natriumascorbat

b) Vorfixierung:

Fixiergemisch: 2.5 % Glutaraldehyd
 10.0 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
 gelöst in Waschmedium
 0.8 % Kaliumhexacyanoferrat

Die vorbehandelten Bakterienzellen werden 3 h in dem Fixiergemisch belassen und danach mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert (5000 U/min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mehrmals mit Waschmedium gewaschen.

Kontrastierung

Zu den fixierten Bakterienzellen wird eine 2 %ige Osmiumtetroxidlösung (OsO_4 in EtOH) in HEPES gegeben und diese bei Raumtemperatur 2 h stehengelassen. Anschließend pelletieren und mit 50mM HEPES waschen.

Einbettung

Im folgenden Schritt werden die kontrastierten Bakterien in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, um sie für das nicht wasserlösliche Einbettungsmittel VCD/HXSA zugänglich zu machen.

Ethanolkonzentration: 30%, 50%, 70%, 90%, 100%.

Die Bakterien verbleiben 5min in den einzelnen Stufen und werden abzentrifugiert.

Nach der letzten Ethanolstufe wird das Einbettungsmittel auf die Bakterien gegeben. Diese werden aufgewirbelt und 24 h stehengelassen.

Danach werden sie wieder pelletiert, in Beemkapseln gegeben und frisches Einbettungsmittel dazugegeben.

Die Proben werden 24 h bei 70° C polymerisiert.

Einbettungsharz: 5.0 g Vinylcyclohexendioxid (VCD) Harz
 10.0 g n-Hexenylbernsteinsäureanhydrid
 (HXSA) Härter
 0.05g 1.4-Butandioldiglycedylether
 (RD-2) Weichmacher
 0.15mlDimethylaminoethanol (DMAE)
 Beschleuniger

Schneiden und Kontrastieren

Das Polymerisat wird am Mikroton (Reichert) mit Glasmessern Ultra-dünn geschnitten.

Diese Schnitte werden auf formvar-beschichtete Kupfer-Netzchen gebracht und nachkontrastiert.

Nachkontrastierung: 4 %ige ethanolische Uranylacetatlsg.
 Bleicitratlösung (Reynolds 1963)
 0.02 N Natronlauge
 20 %iges Ethanol

Die Netzen werden zuerst 15-20min in der Uranylacetatlösung inkubiert, mit Ethanol, Wasser und Natronlauge gewaschen und weiterhin 10min auf dem Bleicitrat belassen. Erneut mit viel Wasser waschen, trocknen lassen.

7. Enzymatischer Test zur Bestimmung des ATP-Gehaltes mit Hilfe der Luciferase

Messung der cyclischen Phosphorylierung mit dem Luciferase-Test. (Ein Biolumineszenztest zur Bestimmung von ATP, Majewsky, 1985)

7.1 In eine mit Stopfen verschließbare Glasküvette werden für eine Bestimmung folgende Lösungen pipettiert:

1.8 ml Reaktionsmedium, (Na-Phosphat-Puffer, 100mM, pH 7.5)
 100.0 µl ADP (100mM = 47.12 mg/ml)
 100.0 µl MgCl_2 (100mM = 20.33 mg/ml)
 30.0 µl Chromatophorensuspension ($\text{OD} = 50\text{cm}^{-1}$)

7.2 Die Küvetten werden mit Argon begast und mit 20000 lux bei 27°C - 28°C belichtet.

7.3 Nach 4 min wird ein Aliquot entnommen und die Reaktion mit 10%iger Trichloressigsäure abgestoppt.

7.4 Das ausgefallene Protein wird abzentrifugiert und der Überstand 1:20 verdünnt mit 100 mM Tris/Acetat, pH 7.5, 2mM EDTA.

- 7.5 Von einem Aliquot dieser Lösung wird die ATP-Bestimmung durchgeführt. Dafür werden in eine spezielle Plastikkuvette folgende Lösungen pipettiert:

140 μ l des o.a. Tris-Puffers
 40 μ l des rekonstituierten ATP-Monito-
 ring-Reagent (LKB)

Anschließend wird in einem Luminometer (LKB) der Blindwert bestimmt. Er sollte nicht größer 10 mV betragen.

- 7.6 Es werden 20 μ l der Probe zugegeben, und wiederum das Lichtsignal gemessen (nicht größer 2000mV).
- 7.7 Schließlich werden noch 20 μ l eines ATP-Standards (10^{-5} M) zupipettiert und gemessen (nicht größer 6000mV).

Der ATP-Gehalt kann nach Korrektur mit dem Blindwert und dem Standard aus einer Eichkurve abgelesen werden. Es sind die Verdünnungsschritte zu berechnen und die Werte um die Dunkelrate zu korrigieren.

$$\text{Berechnung: } mV_{\text{korr.}} = mV_{\text{Probe}} \times \frac{mV \text{ Standard}}{2190 \text{ mV}}$$

(2190 mV ist die Spannung, die der Standard ohne Zusatz von einer Probe besitzt).

8. Elektronen-spin-Resonanz

Gerät: VARIAN E 9

Bedingungen: Scan : 100 Cu
 Field set : 3250 G
 time const. : 0.3 sec
 scan time : 2' x 4
 Med. Amp. : 2.0 Gauss
 Med. Freq. : 100 kHz
 Rec. Gain : 1.25×10^4
 Temp. : -165°C
 Micro Power : 50 mW
 Freq. : 9.13 GHz

9. Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente von Chromatophoren und Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides

9.1 Die Chromatophoren und Reaktionszentren werden auf 1mg/ml Bakteriochlorophyll eingestellt. Von dieser Lösung wird 1ml in einen Quarzkolben pipettiert. Hinzu kommt 1ml eines Reaktionspuffers.

Reaktionspuffer: 20 mM Tricin
 20 mM Magnesiumchlorid
 mit NaOH auf pH 8.0 einstellen

- 9.2 Das Photoaffinitätslabel wird dazugegeben (10 nmol Hemmstoff/ mg BChl) und im Dunkeln 5 min inkubiert.
- 9.3 Der Quarzkolben wird unter Argon-Atmosphäre (Schutzgas) am Rotationsverdampfer bei Eiswasserkühlung 15 min mit UV- Licht bestrahlt (UV: 5×10^4 erg/cm² sec).
Lampenabstand: 30 cm
- 9.4 Nach der Belichtung wird die Lösung sofort in Solubilisierungsmedium für die Gelelektrophorese (Lösung A und B) aufgenommen, mit der entsprechenden Menge Mercaptoethanol versetzt und auf das Gel aufgetragen.
- 9.5 Gelelektrophorese durchführen, Gel fixieren, färben, entfärben und photographieren.
- 9.6 Die Slots ausschneiden und quer zur Laufrichtung in 1 mm breite Stückchen schneiden (The Mickle Gel-Slicer).
Je zwei der Stückchen in 1 ml H₂O bei 60°C 48 h in Scintillationsgläschen auflösen.
10 ml Scintillationsflüssigkeit zugeben und die Radioaktivität in jedem Gläschen bestimmen.

10. Markierung mit [¹⁴C] Bromanil

Die Markierung der Reaktionszentren bzw. der Chromatophoren erfolgt in vitro.

- 10.1 Die Chromatophoren werden in Natrium-Phosphat-Puffer aufgenommen, die Reaktionszentren werden im TL-Puffer belassen.

10.2 Es wird jeweils die Bakteriochlorophyllmenge bestimmt und es werden 10nmol Hemmstoff/Bakteriochlorophyll in das Reagenzglas pipettiert.

10.3 10min Inkubationszeit, anschließend in der gleichen Menge Lösung A und B aufnehmen und Gelelektrophorese sofort durchführen.

10.4 Das Gel fixieren, färben, entfärben und photographieren.

10.5 Wie unter 9.6

11. Fluorographie (Laskey et al., 1975)

11.1 Das gefärbte und wieder entfärbte Gel wird 2x je 1/2 Stunde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gegeben und geschüttelt.

11.2 Das Gel wird anschließend in eine Menge des 20fachen des Gelvolumens 22% PPO (2,5 Diphenyloxazol in DMSO) gegeben und 3 h geschüttelt.

11.3 Gel danach in Wasser geben, um PPO-Präzipitat zu entfernen.

11.4 Gel trocknen und für die Fluorographie weiter verwenden.
(Röntgenfilm auflegen)

12. Messung der Aktivität der Reaktionszentren (steady-state Elektronentransportmessung)

Die Messung der Aktivität erfolgt mit einem Spektralphotometer (Zeiss, M 4 Q III, PM QII) mit Querbelauchung.

Wellenlänge : 550nm (des red. Cytochrom c)

Filter der Querbelauchung: 680nm

Die Messung wird anaerob durchgeführt, d. h., die Küvetten werden mit Argon begast, um zu verhindern, daß red. Cytochrom durch den Luftsauerstoff oxidiert wird.

1ml Reaktionsmedium enthält:

0.9ml 10mM Tris Puffer, pH 7.5

10.0µM reduziertes Cytochrom c
(siehe unten)

3.0µM Ubichinon-6

0.5µM Reaktionszentren (bezogen
auf Bakteriochlorophyll

Reduktion des Cytochrom c:

Es werden ca. 200 mg in 20-30ml Wasser gelöst und mit sehr wenig Natrium-Dithionit versetzt. Die Färbung der Lösung muß noch dunkelrot sein; ist sie hellrosa, ist Na-Dithionit im Überschuß, was zu einer fehlerhaften Messung in der Probenküvette führt.

Die Reagenzien werden nacheinander in die Küvette pipettiert, wobei diese ständig mit Argon begast wird, anschließend wird dicht mit Parafilm abgeschlossen.

Die Oxidation des red. Cytochrom c wird bei 550nm gemessen.

Zur Bestimmung der pI_{50} -Werte verschiedener Hemmstoffe werden diese zuerst in die Küvette gegeben.

13. Entfernung von Ubichinon aus Reaktionszentren (modifiziert nach Dutton)

13.1 Die Reaktionszentren werden mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{802\text{nm}} = 2.88 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ auf 0.2 eingestellt.

13.2 Die Reaktionszentren werden auf eine DEAE-52-Säule gegeben.

Die Säule muß mit einem Wasserbad umgeben sein, welches an einen Kryostaten angeschlossen ist. Die Säule ist auf eine Temperatur von 28°C zu bringen.

Säule: DEAE-52 (Whatman DE 52) wird mit einer Lösung ----- vorgewaschen, die ca. 1 mg Bovine serum albumin pro ml DEAE enthält. Dieses Albumin wird dann mit einer Salzkonzentration, die 20-30% höher ist als zur Elution der Reaktionszentrumsproteine von der Säule eluiert.

Dieser Schritt dient der Absättigung der nicht-ionischen Bindungsstellen des DEAE, zum anderen verbessert es die Elution der hydrophoben Proteine.

13.3 Die RC-Lösung wird dann mit Säulenmaterial dispergiert, indem man sie zu einem Teil des vorgewaschenen Säulenmaterials gibt (RC's in 10mM Tris, 0.1% LDAO).

13.4 Diese so behandelten Reaktionszentren werden auf die bereits gepackte, vorgewaschene Säule gegeben.

13.5 Extraktionspuffer: 10mM Tris-HCl pH 8.0
 10mM 1,10-Phenanthrolin
 1 mM DTT
 4% LDAO

13.6 Die Säule wird mit Extraktionspuffer gewaschen.

Bei allen Schritten muß darauf geachtet werden, daß die Säulentemperatur 28°C nicht unterschreitet.

Hierbei werden 90-98% des Ubichinons in ca. 2 h entfernt.

13.7 Die RC's werden dann wie gewohnt von der Säule eluiert.

13.8 Mengen von 20-30µM Reaktionszentren sind in 0-1% LDAO, 10mM Tris-HCl pH 8.0 für einige Monate stabil bei -20°C und bei -80°C für einige Jahre.

14. Isolierung der H-Untereinheit aus Reaktionszentren

(Debus et al., 1985)

Die H-Untereinheit wird durch Zentrifugation der Reaktionszentren mit Lithiumchlorat gewonnen (LiClO_4).

14.1 Die Reaktionszentren werden über Nacht gegen 50mM Tris-HCl, pH-Wert 7.7 (8.0 ist auch möglich, aber 7.7 ist optimal), 0.1% LDAO dialysiert und anschließend auf eine OD von 12-15 bei einer Wellenlänge von 802nm eingestellt.

Die Konzentrierung der Reaktionszentren erfolgt über eine Membran in der "Amicon-Zelle" (Membran= Diaflo-Ultrafilters YM 30).

14.2 Es werden 0.5ml dieser Reaktionszentren auf 4.6ml einer Lösung von 50mM Tris-HCl, pH-Wert 7.7, 0.1% LDAO, 1.0M LiClO_4 geschichtet, und im Vertikalrotor RP 67 VF (LKB) 5 Stunden bei 67000rpm zentrifugiert (250000 x g).

- 14.3 Am Ende der Zentrifugation wird die H-Untereinheit von der Spitze jedes Röhrchens abgenommen (ca. 0.4ml) und der Rest der Lösung in weitere 4 Fraktionen unterteilt. Die einzelnen Fraktionen werden anschließend mit der SDS-PAGE untersucht und gleich gute Fraktionen vereinigt.
- 14.4 Die Konzentration der H-Untereinheit erhält man mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 46\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei einer Wellenlängenmessung von 280nm.
- 14.5 Die Fraktionen werden eingefroren oder evt. vorher dialysiert.
15. Gewinnung von Antikörpern gegen die H-Untereinheit der Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides (Berzborn, 1980)
- 15.1 Die H-Untereinheit wird nach der o.a. Methode isoliert und gegen 20mM Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7.9 dialysiert. Die Konzentration des Proteins soll ca. 0.10 mg/ml betragen.
- 15.2 Vor der Immunisierung wird dem Kaninchen ca. 20ml Kontrollblut aus der Ohrvene entnommen. Das Serum wird nach Stehen über Nacht abdekantiert, 10 min bei 4000 g durch Zentrifugation geklärt, anschließend durch einen Sterilfilter (Millipore, Sartorius, $0.45\mu\text{m}$) gegeben, und bei -20°C eingefroren.

- 15.3 1ml der Antigenlösung mit 0.1mg Protein wird mit 1.5ml Freudschem Adjuvants (Difco) und 50µl 1M NaCl-Lösung versetzt.
Anschließend wird dieses Gemisch im Plastikröhrchen 10-20sec. unter Eis mit der Ultraschallspitze (Microtip) emulgiert.
- 15.4 In 0.5ml-Portionen wird das Antigen einmal in den Hinterlauf und mehrere Male in den Rücken eingespritzt.
- 15.5 Nach ca. 4 Wochen werden 20ml Kontrollblut aus der Ohrvene entnommen und auf den Gehalt von Antikörpern untersucht (Western-Blot).
- 15.6 Sollte der Titer des Antikörpers im Serum zu gering sein, d.h., wenn bei einer Verdünnung des Serums von 1:50 keine Reaktion mit dem Antigen eintritt, sollte "geboostert" werden.
Hierbei werden 150 µg Antigen in 0.5ml einer 150mM NaCl-Lösung direkt in die Ohrvene des Kaninchens eingespritzt.
- 15.7 Nach weiteren 4 Wochen werden nochmals 20ml Kontrollblut entnommen, und auf den Gehalt von Antikörpern untersucht (Western-Blot).

16. Western-Blot (Towbin et al., 1979)

Der Transfer elektrophoretisch über SDS-PAGE getrennter Proteine auf Nitrocellulose-Filter (Western-Blotting) erfolgt mit dem Trans-Blot-System der Firma BIO-RAD.

a) Lösungen:

Blot-Puffer : 15.5 g Tris
 72.0 g Glycin
 1.0 l MeOH
 ad 5.0 l Wasser dest.

TBS-Puffer : (Tris-Buffered-Saline)
 Ansatz für 4 l
 20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5
 = 9.68g Tris
 +116.96g NaCl
 ad 2.0 l Wasser dest.
 einstellen mit HCl auf pH 7.5
 ad 4.0 l Wasser dest.

TTBS-Puffer : (Tween-20 Wash and Background
 Reductions Solution)
 Ansatz für 2 l
 20mM Tris, 500mM NaCl, 0.05M
 Tween-20, pH 7.5

Herstellung von TBS s.o., zu
 2 l TBS werden 0.5ml Tween-20
 gegeben

Blocking-Solution: Ansatz für 200ml
 (3% Gelatine-TBS)
 6g Gelatine werden auf 200ml
 TBS gegeben. Die Gelatine
 wird durch Erwärmen auf 37°C
 gelöst. Abkühlen auf Raumtem-
 peratur.

Antibody-Buffer: Ansatz für 400ml

(1% Gelatine-TBS)

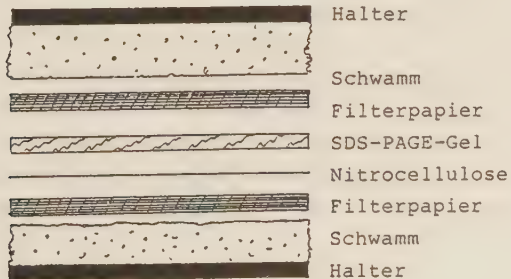
4g Gelatine werden durch Erwärmen auf 37°C in 400ml TBS gelöst. Vor Antikörperzugabe muß die Lösung auf RT abgekühlt sein.

Entwicklung : entwickeln der Blots mit EIA-Purity-Reagent (BIORAD) frisch angesetzt werden:
 -60mg HRP Color Development Reagent im 20ml eiskaltem Methanol lichtgeschützt lösen
 -zu 100ml TBS werden 60 µl eiskaltes H₂O₂ gegeben
 Beide Lösungen bei Raumtemperatur vereinigen. Es entsteht eine 0.015 %ige H₂O₂ - HRP Color Development Solution

b) Durchführung:

1. Die Proteinlösung wird zuerst auf einem Gelsystem aufgetrennt und mit diesem Gel wie folgt verfahren:

Packen eines "Sandwichs"



2. Dieses Sandwich wird in die Blot-Kammer gegeben (Biorad), mit Blot-Puffer gefüllt (vorher Luftblasen aus dem Sandwich entfernen), und unter Kühlung des Blot-Puffers 4 Stunden bei 0.4 A geblottet.

Die Proteine wandern unter diesen Bedingungen in die Nitrocellulose, welche dann weiter bearbeitet wird.

3. Die fertig geblottete Nitrocellulose wird für 1/2 h in die Blocking-Solution gegeben.
4. Über Nacht wird nun die Nitrocellulose mit dem 1. Antikörper inkubiert (in diesem Falle: Antikörper gegen die H-Untereinheit aus Reaktionszentren).

Es werden dazu Verdünnungen von 1:50, 1:100, und 1:500 mit dem Antibody-Puffer angesetzt.

5. Nach Beendigung dieser Inkubation wird je 2x mit TBS-Puffer und TTBS- Puffer 20min gewaschen und mit dem 2. Antikörper (Goat anti-Rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate)gelöst in Antibody-buffer (Verdünnung 1/3000) 1h Stunde inkubiert.

6. Wieder je 2x mit TBS-Puffer und TTBS-Puffer 20min waschen.

7. Zuletzt wird das fertige Entwicklungsgemisch auf die Nitrocellulose gegeben und nach 2-20min erkennt man die hellgrau angefärbten Banden.

8. Ein Abstoppen der Reaktion erreicht man durch Überführen in ein Wasserbad.

9. Blots in Filterpapier legen, trocknen und im Dunkeln aufbewahren.

17. Proteolytische Spaltung von Chromatophoren, Reaktionszentren und der H-Untereinheit aus Reaktionszentren mit V_8 -Protease

- a) Die Chromatophoren befinden sich in Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH-Wert 7.5).
- b) Die Reaktionszentren befinden sich in Tris-LDAO-Puffer (20mM Tris, 0.08% LDAO, pH-Wert 8.0).
- c) Die H-Untereinheit befindet sich in 20mM Tris, 0.1% LDAO pH-Wert 7.7.

In der folgenden Tabelle werden die Konzentrationen angegeben, bei denen die Reaktionszentren, bzw. die H-Untereinheit vollständig gespalten sind.

Proteinlösung	Menge V_8 -Protease
Chromatophoren : 200 μ l einer Lösung mit 1mg BChl/ml	100 μ g
Reaktionszentren : 100 μ l einer Lösung 6 μ M = 45 μ g/100ml	60 μ g
H-Untereinheit : 100 μ l einer Lösung mit 0.22mg/ml	2 μ g

- 17.1 Die Chromatophoren, Reaktionszentren oder die H-Untereinheit werden in Eppendorf-Hütchen gegeben und mit der V_8 -Protease 1/2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

- 17.2 Nach Zugabe von 10 μ l 10% iger Trichloressigsäurelösung wird die Reaktion gestoppt.
- 17.3 Anschließend wird die Proteinlösung im Solubilisierungsmedium für das Gel nach Schagger et al., 1985 (siehe Kap. 5) aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete radioaktiv markierte Hemmstoffe

1. [^{14}C] Atrazin, spez. Akt.: 5.9 mCi/mmol
(Ciba-Geigy-Ltd., Basel, Schweiz)
2. [^{14}C] Azido-Atrazin, spez. Akt.: 19 mCi/mmol
(Johanningmeier et al., 1983)
3. [^3H] Azido-Dinoseb, spez. Akt.: 350 mCi/mmol
(Oettmeier et al., 1980)
4. [^3H] Azido-Plastochinon, spez. Akt.: 214 mCi/mmol
(Oettmeier et al., 1984)
5. [^{14}C] Azido-Thiazol spez. Akt.: 49.6 mCi/mmol
(Schering, Berlin, BRD)
6. [^{14}C] Bromanil, spez. Akt.: 44.8 mCi/mmol
(Oettmeier, W. Dostatni, R., 1987)
7. [^3H] DCMU, spez. Akt.: 171.1 mCi/mmol (Prof. Dr.
I.Ohad, Department of Biol. Chem., Hebrew
University Jerusalem, Israel)
8. [^3H] DNSJ, spez. Akt.: 333 mCi/mmol (Oettmeier et
al., 1982)
9. [^{14}C] Ioxynil, spez. Akt.: 12.5 mCi/mmol (Dr. R.H.
Hewett, May and Baker, ltd., Ongar, England)
10. [^{14}C] Phenisopham, spez. Akt.: 29.4 mCi/mol (Dr.
H.Koetter, Schering AG, Berlin, BRD)
11. [^{14}C] Pikrinsäure, spez. Akt.: 2.1 mCi/mmol,
(Oettmeier und Masson, 1982)

6. LITERATURVERZEICHNIS

Agalidis, I., Reiss-Husson, F., (1983) Biochim. Biophys. Acta, 724, 340-351

Several properties of the LM unit extracted with sodium dodecyl sulfate from Rhodopseudomonas sphaeroides purified reaction centers

Agalidis, I., Velthuys, B.R., (1986) FEBS LETTERS, Vol. 197, No. 1,2 263-266

Oxidation of Q_A and of Q_B^- of photosynthetic reaction centers by an artificial acceptor

Agalidis, I., Nuijs, A.M., Reiss-Husson, F., (1987) Biochim. Biophys. Acta, 890, 242-250

Characterisation of an LM unit purified by affinity chromatography from Rhodobacter sphaeroides reaction centers and interactions with the H subunit

Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., Rees, D.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) Vol. 84, pp. 5730-5734

Structure of the reaction center from Rhodobacter sphaeroides R-26: The cofactors

Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., Rees, D.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1987) Vol. 84, pp. 6162-6166

Structure of the reaction center from Rhodobacter sphaeroides R-26: The protein subunits

Arata, H., Parson, W.W., aus : " Function of Quinones in energy conserving systems" B.L. Trumpower (1982)

Enthalpy and volume changes accompanying electron transfer from P870 to the primary and secondary quinones in photosynthetic reaction centers

Bachmann, R.C., Gillies, K., Takemoto, J.Y., (1981) Biochem., 20, 4590-4596

Membrane Topography of the photosynthetic reaction center polypeptides of Rhodospseudomonas sphaeroides

Barber, J., (1987) TIBS, 12, No. 8, 321-326

Photosynthetic reaction centres: a common link

Bayley, H., Knowles, J.R., (1977) Methods in Enzymology, 46, pp. 69-114

Photoaffinity labeling

Bayley, H., (1983) in: Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology. Laboratory Techniques in Biochem. and Molekular Biologie (Work, T.S., Burdon, R.H. eds.) Elsevier, Amsterdam

Bering, C.L., Bustamante, P.L., Loach, P.A., (1981) Israel J. of Chemistry, Vol. 21, pp.251-258

Inhibiton of the primary photochemical events in Rhodospirillum rubrum by ubiquinone analogues

Berzborn, R., (1980) Meth. in Enzymology, Vol. 69, 492-502

Antibody approach to membrane architecture

Blankenship, R.E., Parson, W.W., (1978) Ann. Rev. Biochem. 47,
635-653

The photochemical electron transfer reactions of
photosynthetic bacteria and plants

Brown, A.E., Gilbert, C.W., Guy, R., Arntzen, C.J., (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81, pp. 6310-6314

Triazine herbicide resistance in the photosynthetic
bacterium Rhodospseudomonas sphaeroides

Bühmann, U., Herrmann, E.C., Kötter, C. Trebst, a., Depka,
B., Wietoska, H., (1987) Z. Naturforschung 42c,
704-712

Inhibition and Photoaffinity Labeling of Photosystem
II by Thiazolyden-ketonitriles

Bugg, M.W., Whitmarsh, J., Rieck, C.E., Cohen, W.S., (1980)
Plant. Physiol. 65, 47-50

Inhibition of photosynthetic electron transport by di-
phenyl ether herbicides

Buschmann, C., Grumbach, K., (1985) Hochschultext,
Physiologie der Photosynthese, Springer-Verlag

Chadwick, B.W., Frank, H.A. (1986) Biochim. Biophys. Acta,
851, 257-266

Electron-spin resonance studies of carotenoids
incorporated into reaction centers of Rhodobac-
ter spaeroides R26.1

Chang, C.-H., Tiede, D., Tang, J., Smith, U., Norris, J., Schiffer, M., (1986) FEBS LETTERS, Vol. 205, No. 2, 82-86

Structure of Rhodopseudomonas sphaeroides R-26 reaction center

Chua, Nam-Hai, (1972) Methods in Enzymology, 69,

Electrophoretic analysis of chloroplast proteins

Clayton, R.K., (1966) Photochem. Photobiol. Vol. 5 pp.669-667

Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls in vitro and in vivo

Clayton, R.K., Wang, R.T., (1971) Meth. in Enzymology, 23, 696-705

Photochemical reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides

Clayton, R.D., Szuts, E.Z., Fleming, H., (1972) Biophysical Journal, Vol. 12, 64-79

Photochemical electron transport in photosynthetic reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides III. Effects of ortho-phenanthroline and other chemicals

Clayton, R.K., Clayton, B.J. (1972) Biochim. Biophys Acta, 283, 492-504

Relations between pigments and proteins in the photosynthetic membranes of Rhodopseudomonas sphaeroides

Clayton, R.D., Fleming, H., Szuts, E.Z. (1972) Biophysical Journal, Vol. 12, 46-63

Photochemical electron transport in photosynthetic reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides II. Interaction with external electron donors and acceptors and a reevaluation of some spectroscopic data

Clayton, R.K., Sistrom, W.R., (1978)

The Photosynthetic Bacteria

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K., (1977) The J. of Biological Chemistry, Vol. 252, No. 3, pp. 1102-1106

Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis

Cogdell, R.J., Thornber, J.P., (1980) FEBS LETTERS, Vol. 122, 1, 1-8

Light-harvesting pigment-protein complexes of purple photosynthetic bacteria

Crofts, A.R., Meinhardt, S.W., Jones, K.R., Snozzi, M., (1983) Biochim. Biophys. Acta, 723, 202-218

The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of Rhodopseudomonas sphaeroides

Crofts, A.R., Wraight, C.A., (1983) Biochim. Biophys. Acta, 726, 149-185

The electrochemical domain of photosynthesis

Debus, R.J., Valkirs, G.E., Okamura, M.Y., Feher, G., (1982)
 Biochim. Biophys. Acta, 682, 500-503

Localization of the secondary quinone-binding site in
 reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides R-26
 by antibody inhibition of electron transfer

Debus, R.J., Feher, G., Okamura, M.Y., (1985) Biochemistry,
 24, 2488-2500

LM Complex of reaction centers from Rhodopseudomonas
sphaeroides R-26: Characterisation and Reconstitution
 with the H subunit

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel, H.,
 (1984) Journal Mol. Biol., 180, 385-398

X-ray structure analysis of a membrane protein
 complex

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel, H.,
 (1985) Nature, Vol. 318, No. 6047, pp.618-624

Structure of the protein subunits in the
 photosynthetic reaction centre of Rhodopseudomonas
viridis at 3Å resolution

Deisenhofer, J., Michel, J., Huber, R., (1985) TIBS, June,
 243-248

The structural basis of photosynthetic light
 reactions in bacteria

Deisenhofer, J., Huber, R., Michel, H., (1987), Spektrum der
 Wissenschaft, August, 1987

Die strukturelle Grundlage der Lichtreaktionen in
 Bakterien

Dostatni, R., (1985) Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum

Kovalente Bindung von Hemmstoffen an Proteine der Thylakoidmembran

Dostatni, R., Meyer, H.E., Oettmeier, W., (1988) FEBS LETTERS im Druck

Mapping of two tyrosine residues involved in the quinone (Q_B) binding site of the D_1 reaction center polypeptide of photosystem II

Douglas von, C. Y., Marrs, B.L., (1987) Spektrum der Wissenschaft, August,

Molekulare Mechanismen der bakteriellen Photosynthese

Drews, G., Giesbrecht, P., (1965), Arch. für Mikrobiologie, 52 242-250

Die Thylakoidstrukturen von Rhodospseudomonas spec.

Dubowchik, G.M., Hamilton, A.D., (1986) J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1391-1394

Towards a synthetic model of the structure of the photosynthetic reaction centre

Fajer, J., Davis, M.S., Forman, A., Klimov, V.V., Dolan, E., K. B., (1980) J. Am. Chem. Soc., Vol. 102, No. 23, 7143-7145

Primary electron acceptors in plant photosynthesis

Feher, G., (1971) Photochem. Photobiol., Vol. 14, pp. 373-387

Some chemical and physical properties of a bacterial reaction center particle and its primary photochemical reactants

Feher, G., Okamura, M.Y., McElroy, J.D., (1972) Biochim. Biophys. Acta, 267, 222-226

Identification of an electron acceptor in reaction centers of Rhodopseudomonas sphaeroides by EPR spectroscopy

Francis, G.A., Richards, W.R., (1980) Biochemistry, 19, 5104-5111

Localisation of photosynthetic membrane components in Rhodopseudomonas sphaeroides by a radioactive labeling procedure

Gardner, G., (1981) Science, Vol. 211, 937-940

Azido-Atrazine: Photoaffinity label for the site of triazine herbicide action in chloroplasts

Giesbrecht, P., Drews, G., (1962), Arch. für Mikrobiologie, 43 152-161

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der Chromatophoren von Rhodospirillum molischianum Giesberger

Giesbrecht, P., Drews, G., (1966), Arch. für Mikrobiologie, 54 297-330

Über die Organisation und die makromolekulare Architektur der Thylakoide "lebender" Bakterien

Gromet-Elhanan, Z. aus: "Function of Quinones in energy conserving systems" B.L. Trumpower (1982)

Electron-Transport and photophosphorylation in photosynthetic bacteria

Gunner, M.R., Braun, B.S., Bruce, J.M., Dutton, P.L., Dep. of Biochem. and Biophys., Univ. of Pennsylvania, PA 19104, USA, unveröffentlicht

LABORATORY REPORT

Characterisation of the Q_A binding-site of the reaction centers of Rhodopseudomonas sphaeroides

Hall, R.L., Kung, M.C., Fu, M., Jales, B.J., Loach, P.A., (1973) Photochem. Photobiol., Vol. 18, pp.505-520

Comparison of phototrap complexes from chromatophores of Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas sphaeroides, and the R-26 mutant of Rhodopseudomonas sphaeroides

Hall, R.L., Doorley, P.F., Niederman, R.A., (1978) Photochem. Photobiol., Vol. 28, pp. 273-276

Trans-Membrane localization of reaction center proteins in Rhodopseudomonas sphaeroides chromatophores

Hartung, A., (1982) Diplomarbeit Universität Bochum

Messung der Photophosphorylation mit dem Luciferase-test

Henderson, R., (1985) Nature, Vol. 318, 598-599

Structure of a bacterial photosynthetic reaction center

Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrander, F., Hood, L.E.,
(1983) Methods in Enzymology, Nr. 91, 227-236

Isolation of microgram quantities of proteins from
polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis

Jackson, J.B., Cogdell, R.J., Crofts, A.R., (1973) Biochim.
Biophys. Acta, 292, 218-225

Some effects of o-phenanthroline on electron transport
in chromatophores from photosynthetic bacteria

Johanningmeier, U., Neumann, e., Oettmeier, W, (1983) J. Bio-
energ. Biomembr. 15, 43-66

Jolchine, G., Reiss-Husson, F., (1974) FEBS LETTERS, 40, 5-8

Comparative studies on two reaction center
preparations from Rhodopseudomonas sphaeroides

Kleinfeld, D., Okamura, M.Y., Feher, G., (1984) Biochim. Bio-
phys. Acta 766, 126-140

Electron transfer in reaction centers of
Rhodopseudomonas sphaeroides

I. Determination of the charge recombination pathway
of $D^+Q_A^- Q_B$ and $Q_AQ_B^-$

Laskey, R.A., Mills, A.D., (1975) Eur. J. Biochem., 56, 335-
341

Quantitative film detection of $[^3H]$ and $[^{14}C]$ in poly-
acrylamide gels by fluorography

Majewski, C., (1983) Diplomarbeit Universität Bochum

Photosynthetische Reaktionen in Purpurbakterien

Marinetti, T.D., Okamura, M.Y., Feher, G., (1979) *Biochemistry*,
Vol. 18, No. 14, 3126-3133

Localisation of primary quinone binding site in
reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides R-26
by photoaffinity labeling

McElroy, J.D., Feher, G., Mauzerall, D.C., (1972) *Biochim.*
Biophys. Acta, 267, 363-374

Characterisation of primary reactants in bacterial
photosynthesis

I. Comparison of the light-induced EPR-signal with
that of a bacteriochlorophyll radical ($g=2.0026$)

Michel, H., Weyer, K.A., Gruenberg, H., Lottspeich, F.,
(1985) *The EMBO Journal* Vol. 4, No. 7, pp.1667-1672

The heavy subunit of the photosynthetic reaction
centre from Rhodopseudomonas viridis: isolation of
the gene, nucleotide and amino acid sequence

Michel, H., Weyer, K.A., Gruenberg, H., Dunger, I.,
Oesterhelt, D., Lottspeich, F., (1986) *The EMBO*
Journal, Vol. 5, No. 6, pp.1149-1158

The light and medium subunits of the photosynthetic
reaction centre from Rhodopseudomonas viri-
dis: isolation of the genes, nucleotide and amino
acid sequence

Michel, H., Epp, O., Deisenhofer, J., (1986b), *The EMBO*
Journal, Vol. 5, No. 10, pp. 2445-2451

Pigment-protein interactions in the photosynthetic
reaction centre from Rhodopseudomonas viridis

Michel, H., Deisenhofer, J., (1988) Biochemistry, Vol. 27,
No.1, 1-7

Relevance of the photosynthetic reaction center from
purple bacteria to the structure of photosystem II

Mitchell, P., (1961), Nature, 191, 144-148

Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen
transfer by a chemiosmotic type of mechanism

Nieß, C., (1986), Diplomarbeit, Ruhruniversität Bochum

Chloroplasten gesunder und emissionsgeschädigter Co-
niferen

Oettmeier, W., Reimer, S., Link, K., (1978) Z. Naturforschung
33c, 695-703

Quantitative Structure-Activity Relationship of
substituted benzoquinones as inhibitors of photosyn-
thetic electron transport

Oettmeier, W., Masson, K., Johanningmeier, U., (1980) FEBS
LETTERS, Vol. 118, No. 2, 267-270

Photoaffinity labeling of the photosystem II
herbicide binding protein

Oettmeier, W., Masson, D., Johanningmeier, U., (1982)
Biochim. Biophys. Acta, 679, 376-383

Evidence for two different herbicide-binding proteins
at the reducing side of photosystem II

Oettmeier, W., Trebst, A., (1983) The Oxygen Evolving System
of Photosynthesis

Inhibitor and plastoquinone binding to photosystem II

Oettmeier, W., Masson, K., Soll, H.-J., Draber, W., (1984)
Biochim. Biophys. Acta, 767, 590-595

Herbicide binding at photosystem II
A new azido-triazinone photoaffinity label

Oettmeier, W., Dostatni, R., (1987) Z. für Naturforschung,
42c, 693-697

Irreversibly binding photosynthetic electron trans-
port inhibitors.II.Halogen-substituted 1,4 Naphtho-
quinones and halogenmethyl-1,4-quinones

Oettmeier, W., Preuße, S., (1987), Z. Naturforschung, 42c,
690-692

Herbicide and quinone binding to Chromatophores and
reaction centers from Rhodobacter sphaeroides

Oettmeier, W., Masson, K., Donner, A., (1988), FEBS LETTERS,
Vol. 231, No. 1, 259-262

Anthraquinone inhibitors of photosystem II electron
transport

Okamura, M.Y., Steiner, L.A., Feher, G., (1974) Biochemistry
Vol 13, No. 7, 1394-1410

Characterisation of reaction centers from photosyn-
thetic bacteria. I. Subunit structure of the protein
mediating the primary photochemistry in Rhodopseu-
domonas sphaeroides R-26

Okamura, M.Y., Isaacson, R.A., Feher, G., (1975) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA Vol. 72, No. 9, pp.3491-3495

Primary acceptor in bacterial photosynthesis:
obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction
centers of Rhodopseudomonas sphaeroides

Okamura, M.Y., Debus, R.J., Kleinfeld, D., Feher, G., aus
"Function of Quinones in energy conserving systems.
B.L. Trumpower (1982)

Quinones binding sites in reaction centers from
photosynthetic bacteria

Ormerod, J.G., (1983) Studies in Microbiology Volume 4

The phototropic bacteria
Anaerobic life in the light

Ovchinnikov, Yu. A., Abdulaev, N.G., Zolotarev, A.S., Shmukler,
B.E., Zargarov, A.A., Kutuzov, M.A., Telezhinskaya, I.N.,
Levina, N.B., (1988) FEBS LETTERS, vol. 231, Nr. 1 237-
242

Photosynthetic reaction centre of Chloroflexus au-
rantiacus. I. Primary structure of L-subunit

Ovchinnikov, Yu.A., Abdulaev, N.G., Shmuckler, B.E., Zargarov, A.A., Kutuzov, M.A., Telezhinskaya, I.N., Levina, N.B., Zolotarev, A.S., (1988b) FEBS LETTERS, Vol.232, Nr. 2, 364-368

Photosynthetic reaction centre of Chloroflexus aurantiacus. Primary structure of M-subunit

Paillotin, G., Vermeiglio, A., Breton, J., (1979), Biochim. Biophys. Acta, 545, 249-264

Orientation of reaction center and antenna chromophores in the photosynthetic membrane of Rhodospseudomonas viridis

Parson, W.W., Cogdell, R.J., (1975) Biochim. Biophys. Acta, 416, 105-149

The primary photochemical reaction of bacterial photosynthesis

Petty, K., Jackson, .B., Dutton, P.L., (1979) Biochim. Biophys. Acta, 546, 17-42

Factors controlling the binding of two protons per electron transferred through the ubiquinone and cytochrome b/c₂ segment of Rhodospseudomonas sphaeroides chromatophores

Pfister, K., Steinback, K.E., Gardner, G., Arntzen, C.J., (1981), Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 78, 981-985

Photoaffinity-Labeling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes

Robinson, H., Yerkes, C., Crofts, A., (1988)
Photosynthesis Research, submitted

Hypothetical 3-D structures for the secondary donors
and acceptors of the photosystem II reaction center

Rosen, D., Okamura, M.Y., Abresch, E.C., Valkirs, G.E.,
Feher, G., (1983) Biochemistry, 22, 335-341

Interaction of cytochrome c with reaction centers of
Rhodopseudomonas sphaeroides R-26: Localization
of the binding site by chemical cross-linking and
immunochemical studies

Rutherford, A.W., (1986) Proc. VII, Int. Cong. Photosynth.
and 614th Meeting, Oxford

How close is the analogy between the reaction centre
of PSII and that of purple bacteria? The electron
acceptor side

Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A., Jagow
von, G., (1985) FEBS LETTERS, Vol. 190, Nr. 1, 89-91

Isolation and amino acid sequence of the smallest
subunit of beef heart bc_1 complex

Schlegel, H.G., (1971) Allgemeine Mikrobiologie, Stuttgart,
Thieme (1971)

Shopes, R.J., Wraight, C.A., (1985) Biochim. Biophys. Acta,
806, 348-356

The acceptor quinone complex of Rhodopseudomonas
viridis reaction center

Slooten, L., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 275, 208-218

Electron acceptors in reaction center preparations
from photosynthetic bacteria

Soll, H.-J., Oettmeier, W., (1984), *Advances in Photosynthesis Research, Proceedings of the VIth International Congress on Photosynthesis, August, 1983, 1984 - 3480 pp. in 4 volumes*

Inhibitor binding and displacement in plastoquinone
depleted chloroplasts

Soll, H.-J., (1985) *Dissertation an der Ruhruniversität Bochum*

Plastochinon- und Hemmstoffbindung am Photosystem II

Stein, R.R., Castellvi, A.L., Bogacz, J.P., Wraight, C.A.,
(1984) *J. of Cellular Biochemistry*, 24, 243-259

Herbicide-quinone competition in the acceptor complex
of photosynthetic reaction centers from Rhodopseudomonas
sphaeroides: A bacterial model for PSII-Herbicide
activity in plants

Steiner, L.A., Okamura, M.Y., Lopes, A.D., Moskowitz, E.,
Feher, G., (1974) *Biochemistry*, Vol. 13, No. 7, 1403-
1410

Characterisation of reaction centers from photosyn-
thetic bacteria. II. Amino acid composition of reac-
tion center protein and its subunit in Rhodopseudo-
monas sphaeroides R-26

Straley, S.C., Parson, W.W., Mauzerall, D.C., Clayton, R.K.
(1973) Biochim. Biophys. Acta, 305, 597-609

Pigment content and molar extinction coefficients of
photochemical reaction centers from Rhodopseudomonas
sphaeroides

Sutton, M.R., Rosen, D., Feher, G., Steiner, L.A., (1982)
Biochemistry, 21, 3842-3849

Amino-terminal sequences of L, M, and H subunits of
reaction centers from the photosynthetic bacterium
Rhodopseudomonas sphaeroides R-26

Tischer, W., Strotmann, H., (1977), Biochim. Biophys. Acta,
460, 113-125

Relationship between inhibitor binding by chloro-
plasts and inhibition of photosynthetic electron
transport

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979) Proc. Natl.
Acad. Vol. 76, No. 9 pp. 4350-4353

Electrophoretic transfer of proteins from polyacryl-
amide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and
some applications

Trebst, A., Harth, E., Draber, W., (1970) Z. für Na-
turforschung, 25b, 1157-1159

A new inhibitor of photosynthetic electron-transport
in isolated chloroplasts

Trebst, A., Reimer, S., Draber, W., Knops, H.J., (1979) Z. für Naturforschung, 34c, 831-840

The effect of analogues of dibromothymoquinone and of bromo-nitrothymol on photosynthetic electron flow

Trebst, A., Draber, W., (1979) in Advances in Pesticide Science Teil 2, (H.Geissbühler,) pp. 223-234

Structure activity correlations of recent herbicides in photosynthetic reactions

Trebst, A., (1980), in Photosynthesis an Nitrogen Fixation Teil C Methods in Enzymology, 69, 675

Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localisation of carriers and energy conserving sites

Trebst, A., (1986) Z. Naturforschung, 41c, 240-245

The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane

Trebst, A., Depka, B., Kraft, B., Johanningmeier, U., (1988), Photosynthesis Research, im Druck

The Q_B site modulates the conformation of the photosystem II reaction center polypeptides

Valkirs, G.E., Feher, G., (1982) The Journal of Cell Biology, Vol. 95, 179-188

Topography of reaction center subunits in the membrane of the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas sphaeroides

Velthuys, B.R., Amesz, J., (1974), Biochim. Biophys. Acta, 333, 85-94

Charge accumulation at the reducing side of system 2 of photosynthesis

Vermeglio, A., Clayton, R.K., (1976) Biochim. Biophys. Acta, 449, 500-515

Orientation of chromophores in reaction centers of Rhodopseudomonas sphaeroides
Evidence for two absorption bands of the dimeric primary electron donor

Vermeglio, A., Clayton, R.K., (1977) Biochim. Biophys. Acta, 461, 159-165

Kinetics of electron transfer between the primary and the secondary electron acceptor in reaction centers from Rhodopseudomonas sphaeroides

Vermeglio, A., Martinet, T., Clayton, R.C., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 77, No. 4 pp. 1809-1813

Mode of inhibition of electron transport by o-phenanthroline in chromatophores and reaction centers of Rhodopseudomonas sphaeroides

Vermeglio, A., aus "Function of Quinones in Energy Conserving Systems" B.L. Trumpower (1982)

Electron transfer between primary and secondary electron acceptors in chromatophores and reaction centers of photosynthetic bacteria

Vernon, L.P., (1968) Bacteriological Reviews, Vol. 32, No. 3.
pp. 243-261

Photochemical and electron transport reactions of
bacterial photosynthesis

Vitry de, C., Diner, B.A., (1984) FEBS LETTERS, 167, 327-331

Photoaffinity labeling of the azido-atrazine receptor
site in reaction centers of Rhodopseudomonas sphae-
roides

Weyer, K.A., Lottspeich, F., Gruenberg, H., Lang, F.,
Oesterhelt, D., Michel, H., (1987) The EMBO Journal,
Vol. 6, No. 8, pp. 2197-2202

Amino acid sequence of the cytochrome subunit of the
photosynthetic reaction centre from the purple bacterium
Rhodopseudomonas viridis

Wiemken, V., Bachofen, R., (1984) Advances in Photosynthesis
Research, Vol II.3.165

The bacterial reaction center: where is the center?

Williams, J.C., Steiner, L.A., Ogden, R.C., Simon, M.I.,
Feher, G., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 80
pp. 6505-6509

Primary structure of the M subunit of the reaction
center from Rhodopseudomonas sphaeroides

Williams, J.C., Steiner, L.A., Feher, G., Simon, M.I., (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pp.7303-7307

Primary structure of the L subunit of the reaction
center from Rhodopseudomonas sphaeroides

Williams, J.C., Steiner, L.A., Feher, G., (1986) PROTEINS, 1, 312-325

Primary structure of the reaction center from
Rhodopseudomonas sphaeroides

Wilson, E., Farley, T.M., Takemoto, J.Y., (1985) The Journal of Biological Chemistry, Vol. 260, No. 18, pp. 10288-10292

Photoaffinity labeling of an antimycin-binding site in Rhodopseudomonas sphaeroides

Wolber, P.K., Steinback, K.E., (1984) Z. Naturforschung, 39c 425-429

Identification of the herbicide binding region on the Q_B -Protein by photoaffinity labeling with azido-atrazine

Wolber, P.K., Eilmann, M., Steinback, K.E., (1986) Arch. of Biochem. and Biophys. Vol. 248, No. 1, pp. 224-233

Mapping of the triazine binding site to a highly conserved region of the Q_B -Protein.

Worland, S.T., Wilson, K.J., Hearst, J.E., Sauer, K., (1984) Biochim. Biophys. Acta, 767, 651-654

Isolation and amino-terminal sequences of subunits from the photosynthetic reaction center of Rhodopseudomonas capsulata

Worland, S.T., Yamagishi, A., Isaac, S., Sauer, K., Hearst, J.E., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, pp. 1774-1778

Labeling quinone-binding sites in photosynthetic reaction centers: A 38-kilodalton protein associated with the acceptor side of photosystem II

Wraight, C.A., (1981) Israel Journal of Chemistry, Vol. 21 pp. 348-354

Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: Evidence for a new model of herbicide activity

Wraight, C.A., aus "Function of Quinones in Energy conserving System" B.L. Trumpower (1982)

The involvement of stable semiquinones in the two-electron gates of plant and bacterial photosystems

Yearly Review, (1979) Photochem. Photobiol. Vol.30, pp. 767-776

The role of quinones in bacterial photosynthesis

Youvan, D.C., Bylina, E.J., Alberti, M., Befusch, H., Hearst, J.E., (1984) Cell, Vol. 37, 949-957

Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction-center, B 870 antenna, and flanking polypeptides from R. capsulata

Youvan, D.C., Marrs, B.L., (1987) Spektrum der Wissenschaft, August, 1987

Molekulare Mechanismen der bakteriellen Photosynthese

Zürrer, H., Snozzi, M., Hanselmann, K., Bachofen, R., (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 460, 273-279

Localization of the subunits of the photosynthetic
reaction centers in the chromatophore membrane of
Rhodospirillum rubrum

L E B E N S L A U F

Persönliches

Silvana Preuße, geb. Piske, geboren am 21. Januar 1960 in Wolfenbüttel, als Tochter des Bundesbahnamtmannes Erhard Piske und seiner Ehefrau Gisela, geb. Heinze.

Seit Mai 1985 verheiratet mit Dipl.-Ing. Axel Preuße.
Tochter Melissa wurde geboren am 03. Januar 1987.

Ausbildung und beruflicher Werdegang

Juni 1966-

April 1969 Besuch der Grundschule in Wolfenbüttel

Juli 1969-

Juni 1978 Besuch des Naturwissenschaftlichen Gymnasiums
im Schloß in Wolfenbüttel

Juni 1978 Abitur im Gymnasium im Schloß

Okt. 1978-

März 1981 Studium der Lebensmittelchemie an der Rheinisch Westfälischen-Technischen Hochschule (RWTH) Aachen im Fach Lebensmittelchemie

April 1981-

Dez. 1983 Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Braunschweig

Dez. 1983 Staatsexamen für Lebensmittelchemiker Teil A

Januar 1984-

Febr. 1985 Einjähriges Praktikum am Staatl. Chem. Untersuchungsamt Braunschweig (nach §18 d. VO über die Ausbildung u. Prüfung für Lebensmittelchemiker, Nieders. GVBl Nr. 3/78

Febr. 1985 Staatsexamen für Lebensmittelchemiker Teil B

seit

Juni 1985 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut Biochemie der Pflanzen der Ruhruniversität Bochum und Anfertigung der vorliegenden Dissertation.

